

Université de Liège

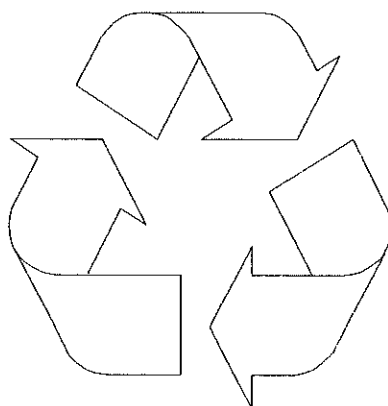
Faculté des Sciences



BIODEGRADATION DES MOLECULES ORGANIQUES NATURELLES ET ARTIFICIELLES EN MILIEU MARIN

Notes de cours
à l'usage des étudiants de Maîtrise en Océanologie

Mathieu POULICEK
Maître de Conférences



Année académique 1992-93

SOMMAIRE

1.- INTRODUCTION

2.- LES PROCESSUS DE BIODEGRADATION DES MOLECULES ORGANIQUES "NATURELLES"

- 2.1 Etat d'organisation des communautés de microorganismes
- 2.2 Hétérogénéité de la distribution des microorganismes et échelles d'observation
- 2.3 Bactéries libres et fixées sur des particules
- 2.4 Périodicité de l'activité microbienne
- 2.5 L'oligotrophie et ses conséquences
 - 2.5.1 Conditions trophiques environnementales
 - 2.5.2 Adaptations des microorganismes aux contraintes nutritionnelles du milieu océanique
 - 2.5.3 Oligotrophie : mythe ou réalité ?
- 2.6 Etude des activités enzymatiques de dégradation
 - 2.6.1 Ecto-, exo- et endohydrolases
 - 2.6.2 Altérations des cinétiques enzymatiques
- 2.7 Modalités de la biodégradation des molécules organiques naturelles

3.- LES MODELES MATHEMATIQUES DE BIODEGRADATION

- 3.1 Modèle de Billen et Servais
- 3.2 Modèles géochimiques
 - 3.2.1 Modèle Multi-G de Berner et Turekian
 - 3.2.2 Power-model de Middelburg
 - 3.2.3 Modèle de Wollast de recyclage des nutriments azotés

4.- POLLUTIONS ET BIODEGRADATION

- 4.1 Biodégradation des effluents domestiques
 - 4.1.1 Stations d'épuration littorales et rejets urbains
 - 4.1.2 Biodégradation des lessives et détergents
- 4.2 Biodégradation des effluents industriels
 - 4.2.1 Les composés cycliques et polycycliques
 - 4.2.2 Le cas des cycles polychlorés (pesticides et PCBs)
- 4.3 Biodégradation des hydrocarbures
 - 4.3.1 Composition des hydrocarbures pétroliers
 - 4.3.2 Dégradation et dispersion des hydrocarbures
 - 4.3.3 Approches expérimentales de la biodégradation des hydrocarbures
- 4.4 Biodégradation des plastiques
- 4.5 Biodégradation des ciments et bétons

5.- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

INTRODUCTION

L'immensité du domaine marin est plus une évidence géographique qu'une réalité biologique et écologique. En fait, seuls les eaux et les fonds des plateaux continentaux, qui ne représentent qu'environ 7.6 % de la surface de l'océan mondial sont richement peuplés et sont à l'origine de plus de 85 % des apports totaux de la pêche et de la totalité des apports de la mariculture. Si, de cet aspect "exploitation", le grand public est généralement peu conscient, en revanche, la place de plus en plus importante occupée par les activités balnéaires et nautiques de notre civilisation de loisirs a sensibilisé l'opinion au problème de la **mer poubelle**.

Des rejets multiples, directs (rejets des effluents urbains des villes côtières, immersion de résidus de combustibles nucléaires, incinération ou "dumping", ...) et indirects (par l'intermédiaire de la charge des grands fleuves, du ruissellement, ...), ont affecté, et affecteront encore longtemps la province néritique des mers bordant les régions industrialisées.

Dans cette optique, le problème du devenir à long terme des déchets de notre civilisation se pose de manière cruciale. Partant de l'observation des grands équilibres biogéochimiques, on pourrait se poser la question de l'émergence de systèmes de "recyclage" de ces composés d'origine anthropique.

Qu'en est-il des mécanismes de biodégradation des composés organiques "non naturels" introduits dans le milieu marin ?

Dans la suite de ces notes, nous allons discuter les mécanismes de dégradation et de recyclage des composés artificiellement introduits dans le milieu marin, en partant des concepts développés dans le cadre des travaux concernant la biodégradation des molécules organiques "naturelles". Nous attirerons l'attention sur la complexité de l'étude de ces processus de biodégradation, difficultés techniques d'une part (analyse des hydrocarbures, détection de seuils d'activités hydrolytiques très bas, ...), difficultés liées au flou entourant certains concepts (bactéries liées ou non, qu'est ce que la "matière en suspension", ...), difficultés liées enfin à la complexité même des processus étudiés (inhibition évolutive des hydrolases par les acides humiques, renversement potentiel des rôles des microorganismes hétérotrophes en fonction des contraintes du milieu, ...). Bien que l'essentiel des processus d'oxydation des composés organiques en milieu marin soit imputable à l'action des microorganismes, d'autres phénomènes entrent également en jeu, par exemple la photo oxydation (photolyse des hydrocarbures et des cycles polychlorés, ...) et l'intervention de la macrofaune (absorption directe de particules de matières plastiques ou de micro gouttes d'hydrocarbures et transformation dans le tube digestif des méazoaires, ...). Ces deux voies de dégradation n'ont guère été quantifiées sinon dans des cas assez particuliers, et ne seront évoquées ici que dans la mesure où elles interfèrent avec les processus de biodégradation microbiens.

La biodégradation d'une molécule organique par des microorganismes sera conditionnée par les cinq ensembles de conditions suivantes.

1.- Biodégradabilité du substrat

Le substrat doit présenter une configuration chimique telle qu'elle puisse "entrer" dans une chaîne catabolique existante. De plus le coût énergétique d'une telle dégradation ne doit pas être supérieur au bénéfice énergétique qu'en tire le microorganisme.

Les métabolites "naturels" sont très rapidement dégradés de même que la plupart des polymères. De manière générale, la complexité structurale des molécules est inversement proportionnelle à la facilité (et donc la rapidité) de leur dégradation : les structures cycliques se dégradent plus lentement que les structures aliphatiques, les polymères aromatiques manifestant les caractéristiques de dégradation les plus complexes, et donc le caractère réfractaire le plus important (par exemple la lignine parmi les composés naturels). Toutefois la versatilité et la diversité des voies métaboliques rencontrées chez les microorganismes marins (essentiellement bactéries et fungi) font en sorte que la grande majorité des composants organiques, même de synthèse, sont dégradés plus ou moins rapidement.

Ici se pose le problème de l'équilibre entre les apports au milieu naturel d'une part, et la quantité de matériel susceptible d'être dégradée dans le même laps de temps. Cet équilibre est loin d'être réalisé à l'heure actuelle, entraînant l'accumulation de composés non dégradés dans les milieux naturels. A cet égard, l'exemple des pesticides organochlorés et des polychlorobiphényles est tout à fait symptomatique (voir cours Ecotoxicologie, J.P. THOME, 2LZ).

2.- Présence des microorganismes "adéquats"

La seconde condition implique la présence, dans le milieu, de microorganismes ayant les capacités de cataboliser le substrat étudié. Les communautés microbiennes présentes en milieu marin contiennent, en général, une grande diversité de souches présentant des types physiologiques variés de manière telle que le spectre des potentialités cataboliques est assez large.

De plus, un bon nombre d'enzymes hydrolytiques intervenant dans ces processus de dégradation sont inductibles : la présence du substrat est nécessaire pour que l'enzyme soit synthétisée en abondance et éventuellement sécrétée dans le milieu extérieur.

Ainsi la présence d'un substrat potentiellement biodégradable induira deux effets sur la population microbienne présente :

- ♦ sélection des souches présentes ayant le maximum de capacités à tirer parti d'un substrat donné, et multiplication de leur nombre,
- ♦ induction enzymatique chez ces microorganismes, conduisant à l'augmentation des capacités cataboliques de chaque microorganisme concerné.

3.- Interactions entre les microorganismes

Des études in-vitro ont montré que des microorganismes cultivés ensemble interagissent de façon multiple. Toutefois l'ampleur de ces interactions et leur incidence sur le processus de biodégradation en conditions naturelles est, évidemment, impossible à préciser. Par exemple, la production de CO_2 suite à l'oxydation des composés organiques par les bactéries favorise la prolifération des cyanophycées, elles-mêmes capable d'exsuder de nouveaux composés susceptibles d'être dégradés. Par contre, la production d'antibiotiques par ces algues bleues interviendra dans un sens opposé, en limitant le nombre et la diversité des souches présentes. De même, on a remarqué que les blooms de *Phaeocystis* s'accompagnent d'une augmentation du nombre de cellules bactériennes viables et d'une

nette diminution de leur diversité. Des composés organiques présents peuvent également exercer un certain contrôle : les composés phénoliques présents dans les exsudats algaires, les matières humiques et les effluents urbains inhibent la reproduction de certaines souches suite au développement extrême des cellules capables de métaboliser ces substrats.

4.- Interactions entre les substrats

La présence simultanée de plusieurs substrats potentiellement dégradables peut affecter leur vitesse de biodégradation. La molécule la plus facilement oxydable sera dégradée en premier lieu (ou celle qui génère le maximum d'énergie libre), laissant les autres substrats plus réfractaires non dégradés. Ceci démontre les précautions à prendre lors de l'estimation des taux de biodégradation en conditions naturelles à partir de données de laboratoire.

Un autre type d'interaction entre les substrats est appelé co-oxydation : ceci implique la dégradation d'une molécule réfractaire uniquement en présence d'un autre substrat. Par exemple, *Mycobacterium rhodocroes* est capable d'oxyder un certain nombre de composés aromatiques méthylés en présence de n-décane. L'absence de cet hydrocarbure dans le milieu inhibe complètement les possibilités d'ouverture des cycles aromatiques.

5.- Conditions environnementales

La présence d'un substrat potentiellement dégradable et d'une souche de microorganisme "compétent" ne suffit pas. Encore faut-il que les conditions de l'environnement soient favorables. Parmi les paramètres édaphiques à prendre en compte figurent la température et la présence d'oxygène, le potentiel d'oxydoréduction, la pression hydrostatique, la présence de molécules inhibitrices ou activatrices, ...

En mer du Nord, on constate des fluctuations importantes des taux de catabolisation du glucose et des acides aminés et de l'incorporation de l'acétate en fonction des saisons. Ceci est vraisemblablement un reflet de l'adaptation des communautés bactériennes aux fluctuations de température (sélection de souches psychro- ou thermophiles suivant les saisons).

La présence de nutriments (phosphate et nitrate) est indispensable à la dégradation d'un grand nombre de composés artificiels, notamment les hydrocarbures. Dans ces conditions, la teneur en N du milieu sera limitante. D'autre part les polyphénols (acides humiques, ...) adsorbés sur les protéines auront une certaine tendance à la formation de micelles inactivant les activités hydrolytiques (inhibition non-compétitive). La présence d'oxygène (souvent couplée au potentiel d'oxydoréduction) sera prépondérante pour la détermination des types de communautés microbiennes rencontrées au sein des sédiments, et donc pour la prévision des activités de dégradation. Un grand nombre de composés ne pourront être dégradés qu'en présence d'oxygène, le milieu anaérobie ayant des caractéristiques particulières (faible diversité des potentialités hydrolytiques des microorganismes) variant en fonction des accepteurs d'électrons prépondérants dans le milieu (sulfatoréduction, réduction du fer ou du manganèse, méthanogenèse, ...).

Les microorganismes ne seront pas à même de dégrader un substrat trop dilué (dépendant de la constante de demi-saturation du système enzymatique concerné). La vitesse de dégradation d'un substrat donné varie en fonction de la concentration de ce substrat et des organismes impliqués (compétition entre bactéries et microorganismes eucaryotes). Il est à remarquer que la dilution extrême des rejets de polluants, si elle est grossièrement favorable au milieu, va à l'encontre des possibilités de biodégradation de ce polluant.

2.- LES PROCESSUS DE BIODEGRADATION DES MOLECULES ORGANIQUES "NATURELLES"

2.1 Etat d'organisation des communautés de micro-organismes

Comme tous les organismes vivants, les micro-organismes (bactéries, levures, fungi, microflagellates) répondent aux conditions biotiques et abiotiques de l'environnement en développant des relations conduisant à la **structuration de communautés** plus ou moins diversifiées. Toute perturbation de l'écosystème (par exemple une eutrophisation ou l'injection d'un "polluant") induit une modification de l'état d'organisation de ces communautés. Dans le cas des micro-organismes, la détermination de ces structures est particulièrement difficile et conduit au concept d'écotype" - dont le rang taxonomique est assimilé à celui de l'espèce - permettant le calcul d'indices de diversité.

Il est ainsi possible de mettre en évidence d'amples variations de l'état d'organisation des communautés microbiennes hétérotrophes, en fonction des cycles vitaux des communautés planctoniques, des apports au milieu marin, ... De même, la forte sensibilité des micro-organismes aux conditions ambiantes, et la rapidité de leurs réactions aux variations du milieu, confèrent à ces micro-organismes un **rôle de bioindicateur**. Ce rôle peut être apprécié en suivant le comportement des cellules bactériennes, et, en particulier, l'évolution de leur diversité.

2.2 Hétérogénéité de la distribution des micro-organismes et échelles d'observation

L'état liquide confère aux océans, du moins en théorie, de grandes capacités d'échange et de communication. En fait, une des caractéristiques du système océanique est sa stabilité. La propagation des fluctuations des différents facteurs physiques et chimiques (température, lumière, pH, rH, concentration de molécules en solution, ...) se présente sous forme de gradients, conférant une nature hétérogène à ce milieu aquatique. Il y a donc une dualité constante entre une certaine stabilité à grande échelle et une hétérogénéité à faible échelle, concernant directement le compartiment microbien. A cette hétérogénéité constituée par des gradients, se superpose localement des variations beaucoup plus nettes des facteurs de l'environnement, où les conditions de vie pour les micro-organismes sont particulières, les fronts et les interfaces (fronts thermiques et thermocline, micro couche épineustonique, interface sédimentaire, ...).

En pleine eau, l'ensemble de ces caractéristiques physiques et chimiques imposent comme condition nécessaire à la vie, l'agrégation des organismes, conduisant à la classique distribution en "taches" bien connue des océanographes. Les raisons d'être principales de cette distribution sont :

- ♦ l'action des gradients de distribution des paramètres édaphiques
- ♦ l'advection non régulière due aux vents et à la turbulence
- ♦ la reproduction (des produits agrégés provenant de "parents" agrégés)
- ♦ les interactions trophiques

Tenant compte de cette distribution, la répartition des micro-organismes doit donc être considérée à travers la "fenêtre biologique" de Ducklow. L'étendue de cette fenêtre est déterminée par les processus biologiques (croissance, interactions, ...) et elle est émoussée par les forces diffusives qui tendent à dissiper les taches. Pour le phytoplancton, les dimensions critiques de cette "fenêtre" seraient de 50-100 m à 5-25 km. Les études portant sur l'existence d'une "fenêtre bactériologique" sont rares. On a proposé une taille critique de 50-100 m, basée sur des éléments théoriques. En fait elle

est à déterminer en tenant compte des mécanismes propres à la régulation des effectifs bactériens et des échelles de variation temporelle et spatiale qui les affectent. Les variations de temps sont de l'ordre de la minute à l'heure et les distances à considérer de quelques microns à quelques centimètres.

Sans la présence de substrat organique leur assurant une source de carbone et d'énergie, les micro-organismes hétérotrophes ne peuvent se développer. Logiquement, une corrélation doit donc exister entre la productivité d'une eau et l'abondance des micro-organismes présents. On constate qu'à grande échelle (>100 km) tel est bien le cas : la biomasse microbienne est positivement corrélée à la quantité de chlorophylle a. A cette échelle, les effectifs bactériens sont, en fait, plus influencés par le stock de producteurs primaires que par la production de ces derniers. Ce phénomène serait dû à l'utilisation de la matière d'origine photosynthétique, principalement sous la forme de cellules moribondes ou mortes, ou encore sous la forme de matériel cellulaire libéré par l'éclatement des cellules lors du broutage par le zooplancton. Cette corrélation positive des biomasses phytoplanctonique et microbienne permet également de rendre compte de l'abondance des micro-organismes et de l'intensité de l'activité hétérotrophe au niveau des *fronts océaniques* (la mise en évidence des bactéries révèle des effectifs 10 fois supérieurs à ceux de la mer ouverte proche). Dans le cas des fronts estuariens, les bactéries sont plus abondantes dans l'eau "douce" que dans les eaux "salées". Mais les activités bactériennes, exprimées en taux d'incorporation de thymidine ou de leucine, sont similaires dans les deux écosystèmes, ce qui démontre une plus grande activité par cellule dans l'eau de mer que dans l'eau douce. Dans la couche interfaciale ED/EM, les concentrations bactériennes sont faibles mais les taux métaboliques sont très élevés. Cette importante biomasse bactérienne produite peut être rapidement exportée en mer par les organismes brouteurs.

Les *sédiments* constituent des habitats complexes (et donc fortement hétérogènes) favorisant la prolifération des micro-organismes. Les nutriments particuliers, sédimentant par gravitation à travers la colonne d'eau, se concentrent à la surface du sédiment (*interface sédimentaire*), où l'afflux de matière organique permet le développement de populations bactériennes nettement plus importantes que celles présentes dans l'eau sus-jacente. Les premiers centimètres des sédiments contiennent des quantités relativement élevées de bactéries et ces effectifs diminuent avec l'augmentation de la hauteur de la colonne d'eau. Ils diminuent également avec l'enfouissement, diminution qui semble dépendre plus de l'épuisement en nutriments disponibles que de l'établissement de conditions anoxiques.

Une attention particulière doit être apportée à la micro couche de surface (*interface air-mer*). Des accumulations importantes de bactéries ont été souvent observées dans cette micro couche. Les valeurs du facteur d'enrichissement (FE, rapport des effectifs de la micro couche à ceux des eaux sous-jacentes, entre 10 cm et 1 m) comprises entre 10^2 et 10^4 sont courantes, et ceci indépendamment du mode de prélèvement ou de la technique de dénombrement. Une telle accumulation passe en général inaperçue avec des moyens de prélèvement classiques (bouteilles à renversement, pompes, ...) du fait de la dilution de la micro couche dans un volume beaucoup plus important d'eaux sous-jacentes. Quant à l'origine de cet enrichissement, deux hypothèses peuvent être retenues : mécanismes de transport d'une part, et/ou développement sur place de populations microbiennes d'autre part.

Une migration par tropisme étant a priori exclue, ces transferts ne peuvent être que passifs. Dans les mécanismes de transfert, les moins étudiés concernent les dépôts atmosphériques directs. Or ceux-ci sont vecteur d'enrichissement de la micro couche en

matière organique continentale, et particulièrement en polluants anthropogéniques. Un apport de bactéries terrigènes est donc probable. La migration, à partir des eaux sous-jacentes, de micro-organismes fixés à des particules ou à des microbulles a, par contre, été beaucoup mieux étudiée. Le mode de transport par adsorption sur des bulles se traduirait même, in fine, par un transfert dans la phase aérienne avec les aérosols. D'après des études en laboratoire, ce transfert serait directement lié, non seulement au diamètre moyen des bulles, mais aussi à la concentration initiale en bactéries du milieu expérimental (fig.2.1). L'optimum est obtenu, dans les deux cas, pour un diamètre compris entre 40 et 60 μm ; mais pour des différences de 10^2 dans les effectifs, le facteur de concentration maximal n'est que décuplé.

La présence de particules en suspension (beaucoup plus abondantes à proximité des côtes que dans la province océanique) favoriserait considérablement le transport des bactéries vers la surface. Le facteur d'enrichissement des bactéries à l'interface apparaît comme une fonction linéaire du pourcentage de bactéries fixées aux particules dans la micro couche de surface (Fig.2.2).

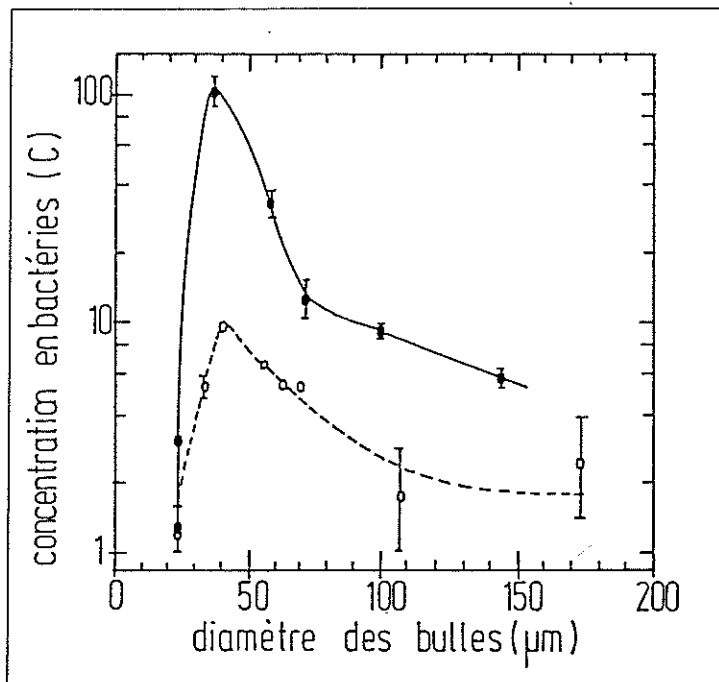


Figure 2.1

Transport de bactéries à la surface par des bulles de différents diamètres et leur facteur d'enrichissement de la micro couche (pop. init. 10^4 cell/ml en traits interrompus, 10^6 cell/ml en trait plein) [Bezdek & Carlucci, 1972]

Les bactéries seraient maintenues dans les films organiques de surface par les caractéristiques hydrophobes de leur paroi. Ce point, démontré in vitro, a été confirmé chez des populations naturelles isolées de la micro couche, qui auraient des capacités d'interactions plus prononcées avec les films lipidiques que celles des micro-organismes des eaux sous-jacentes.

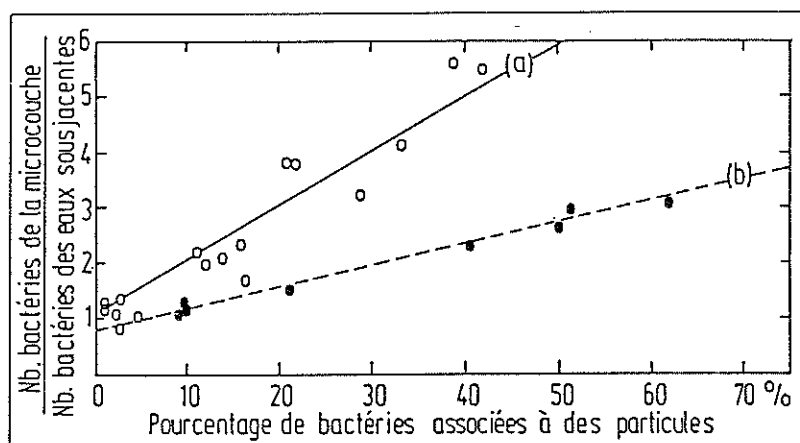


Figure 2.2 : Relation entre le pourcentage de bactéries fixées à des particules dans la micro couche et leur facteur d'enrichissement par rapport aux eaux sous-jacentes dans deux sites naturels [Harvey & Young, 1980]

Cette forte densité bactérienne pourrait également être due à un développement extrêmement rapide, dès la formation du film. Transfert et développement in-situ ne sont pas antagonistes : des bactéries des eaux sous-jacentes peuvent, libres ou associées à des bulles ou à des particules, être entraînées à l'interface par les mêmes mécanismes que ceux qui sont à l'origine de la formation des slicks, et là s'opérerait une sélection des souches pouvant résister aux conditions de vie dans ce milieu. Les conditions favorables sont l'abondance et la diversité des substrats métabolisables. Les conditions défavorables sont plus nombreuses : la brève durée de vie des structures de la micro couche (quelques dizaines de minutes à quelques dizaines d'heures), strictement sous la dépendance de la vitesse du vent et de l'état d'agitation de la mer réduit considérablement le laps de temps nécessaire à la multiplication des cellules, contrôlées de plus par la pression de prédation (ciliés). La présence de polluants joue également un rôle : les films de surface étant un site d'accumulation de substances anthropogéniques, certains peuvent être source d'énergie (hydrocarbures) et d'autres inhibiteurs du métabolisme bactérien (pesticides, détergents, ...) en fonction de leur nature et des souches envisagées. Enfin, l'influence des UV est également un facteur inhibiteur.

Les données de la littérature relatives à l'activité hétérotrophe du bactérioneuston sont très contradictoires : certains auteurs indiquent une activité considérablement plus faible à l'interface que dans les eaux sous-jacentes, d'autres indiquent le contraire (grandes capacités hydrolytiques et métaboliques, consommation élevée en oxygène, ...), avec, de plus, une plus grande proportion de bactéries métaboliquement actives. On a pu montrer que ces bactéries sont parfaitement à même de dégrader du pétrole brut, voire même des composés aussi résistants que les précurseurs des asphaltènes, facilitant ainsi leur photo oxydation (v. chapitre 4). Si on suppose que l'origine de ces mécanismes réside dans l'induction de chaînes enzymatiques particulières, de telles observations peuvent avoir des retombées biotechnologiques importantes. Si on retient l'hypothèse d'un développement bactérien dans la micro couche consécutif à une sélection drastique des souches adaptées, ces mécanismes d'adaptation doivent être très rapides, et, en tout état de cause, beaucoup plus rapides, compte tenu de la faible durée de vie de des films de surface, que ceux intervenant dans la masse d'eau.

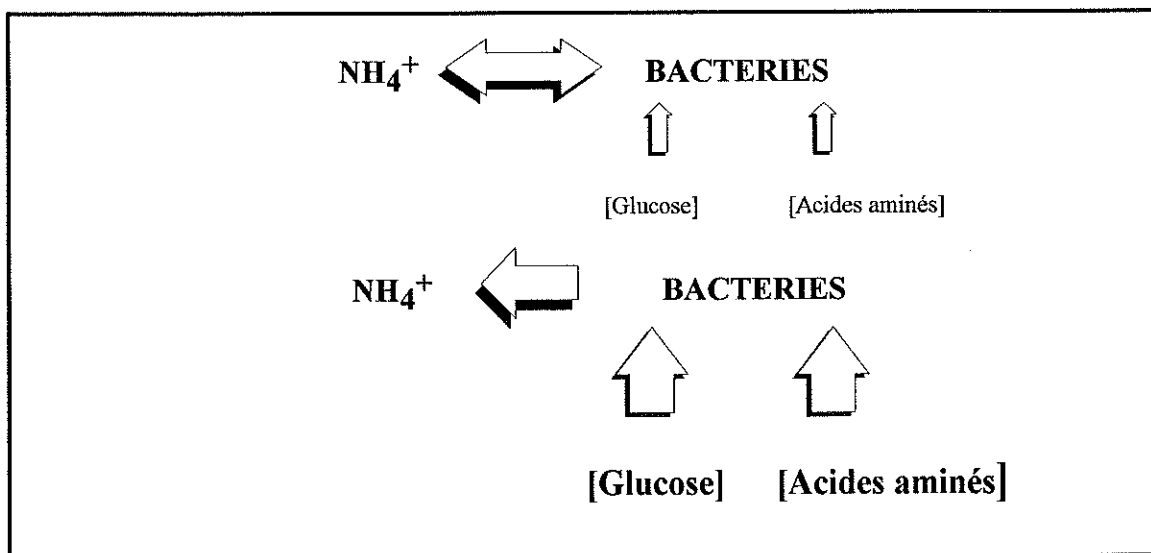
Les micro-organismes de la micro couche de surface, bien que relativement mal connus, sont à même de jouer un rôle de premier plan en océanographie. Sans vouloir être exhaustif, on peut relever les situations suivantes :

- ♦ la micro couche de surface présente, par rapport aux couches sous-jacentes, l'originalité d'être le lieu d'une photo inhibition nette de la production primaire, alors que beaucoup de résultats attestent une activité hétérotrophe importante. Ainsi la micro couche de surface serait plutôt émettrice de CO_2 que consommatrice. La question se pose donc de savoir si, malgré leur fugacité dans le temps et l'espace, ces phénomènes ne doivent pas être pris en compte dans les études des interactions mer-atmosphère.

- ♦ La présence de films organiques à la surface de la mer à des conséquences sur les propriétés mécaniques (et donc sur les transferts d'énergie entre l'atmosphère et l'océan) et chimiques (transferts de composés volatils). On sait que les bactéries et le phytoplancton produisent des substances tensioactives. Cette production de surfactants, faute d'informations, est rarement prise en compte dans les modèles de transfert entre les deux fluides.

- ♦ Comme signalé plus haut, la micro couche de surface est un lieu d'accumulation de polluants (métaux lourds, pesticides, PCBs, hydrocarbures, ...). Le bactérioneuston pourra jouer soit un rôle de vecteur vertical pour ces composés (lors de leur consommation par des prédateurs ou au moment de la dilacération des films de surface), soit contribuer à la détoxification et à la biodégradation de ces polluants (par exemple les composés naphthaléniques des hydrocarbures).

- ♦ Dans la micro couche, accumulation de matière organique et de bactéries concourent à l'existence d'une dégradation active et d'une production de sels nutritifs. Cette production est sans doute réinjectée dans les eaux sous-jacentes, soit par diffusion, soit lors de la dilacération turbulente des films de surface, soit après utilisation in situ par des phytoplanctontes eux aussi adaptés à ce microenvironnement. Dans ce cas, les conditions de l'environnement détermineront si les bactéries entrent ou non en compétition avec le phytoplancton pour certains nutriments comme l'ammonium. La production régénérée d' NH_4^+ par les bactéries est positive dans un environnement non limité en azote et en substrats énergétiques. Les bactéries entrent en compétition avec les phytoplanctontes à basse concentration en NH_4^+ . Dans ce cas, les bactéries ont un système d'uptake de ce nutriment plus performant que les phytoplanctontes. Par contre, lorsque les teneurs en NH_4^+ sont élevées, le système d'uptake bactérien est saturé (fig.2.3) et le système d'uptake à haut flux des cellules végétales est favorisé. Ainsi, la micro couche pourra voir son rôle se renverser selon les conditions de l'environnement.



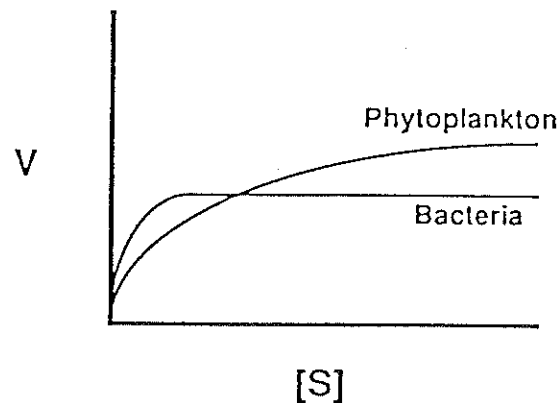


Figure 2.3 Compétition entre bactéries et phytoplancton pour des basses concentrations en nutriments (vitesse du système d'uptake en fonction de la concentration dans l'environnement) [d'après AZAM, sous presse]

2.3 Bactéries libres et bactéries fixées sur des particules

La phase aqueuse des océans contient un ensemble de particules en suspension d'origines diverses, pouvant servir de support éventuel aux micro-organismes. Les eaux de la province néritique (eaux côtières et estuariennes) sont chargées de nombreuses particules d'origine terrigène. Au large, des particules peuvent arriver par voie aérienne et se charger en acides gras et hydrates de carbone en traversant la micro couche de surface. La formation de l'"organic snow" au sein de la colonne d'eau par agrégation des particules en suspension, pourrait avoir une origine microbienne.

Historiquement, c'est ZoBell qui, en 1943, a émis le premier l'hypothèse selon laquelle, en milieu oligotrophe marin, les micro-organismes hétérotrophes trouvaient un avantage nutritionnel en se fixant sur des particules où la matière organique dissoute pouvait s'adsorber. Il expliquait, par une concentration en substrats organiques plus élevée que celle du milieu environnant, la présence et la croissance des bactéries hétérotrophes sur la phase particulaire des milieux oligotrophes. Depuis 10 ans de nombreux milieux ont été prospectés pour évaluer le rôle respectif des bactéries libres et des bactéries fixées dans les transformations de la matière organique. De manière générale, le milieu océanique contient 10 fois moins de matière organique sous forme particulaire que sous forme dissoute, ce qui tendrait à expliquer qu'il y a relativement peu de bactéries attachées. Ce pourcentage varie cependant en fonction de la nature des particules, de l'éloignement par rapport à la côte, de la profondeur et de la saison.

Les résultats publiés montrent que, dans les eaux côtières et pélagiques, la fraction des effectifs bactériens attachés sur des particules dépasse rarement 4% du total, avec des exemples où les valeurs sont inférieures à 1%. En milieu estuarien la situation est plus confuse : certains ont montré que la plus grande partie des bactéries sont fixées aux particules tandis que d'autres mesures ont mis en évidence un maximum de bactéries libres dans les eaux à turbidité maximale. En réalité, l'importance relative des bactéries libres et fixées dépend de la nature chimique de la particule.

L'estimation des capacités hétérotrophes des bactéries adsorbées par rapport à celles des autres populations microbiennes de l'écosystème peut, elle aussi, varier dans une large mesure selon les travaux considérés. Pour certains, les bactéries fixées déploient une activité plus importante que les bactéries libres. L'interface solide-liquide jouerait ici un rôle favorisant l'activité bactérienne. Une particule crée un microenvironnement dans

lequel les variations de flux sont réduites par adsorption des nutriments et excrétion, par les bactéries, d'exopolymères. A l'opposé, par le jeu des filtrations différentielles, on a constaté que de 50 à plus de 90 % de l'activité hétérotrophe se retrouvait dans la fraction inférieure à 3 μm .

Le tableau 2.1 ci dessous reprend les résultats d'une expérience menée au large des Açores. On y a mesuré la vitesse d'hydrolyse d'un substrat synthétique (la Leu-MCA, permettant la mesure de l'activité de Leu-aminopeptidase) ainsi que l'incorporation de Leu en fonction de la teneur du milieu d'incubation en substrat. Les mesures ont été faites sur la population bactérienne totale, les bactéries libres (< 3 μm) et les bactéries adsorbées (> 3 μm). Des comptages en épifluorescence ont montré que 82 % des bactéries étaient libres, 18 % étaient associées à des particules en suspension. Les résultats montrent que près de 60 % de l'activité d'hydrolyse est attribuable aux bactéries fixées sur des particules, même si elles ne représentent que 18 % de la population. Par contre, l'activité d'uptake est moins intense (25-45 % de l'incorporation de Leu). On pourrait donc conclure que le rôle des bactéries fixées serait essentiellement l'hydrolyse de la MOP polymérique alors que les bactéries libres joueraient un plus grand rôle dans l'uptake et la production bactérienne.

Tableau 2.1 : Activités d'hydrolyse des protéines et d'uptake d'AA par des bactéries libres et liées

Leu-MCA concentration ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	A: Leu-MCA hydrolysis ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{h}^{-1}$)	B: Leucine incorporation ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{h}^{-1}$)	A ÷ B
Total bacterial population			
7.2	0.12	0.04	3
72	0.82	0.09	9
360	2.41	0.11	21
720	3.89	0.12	32
Fraction of <3 μm (mainly free-living bacteria)			
7.2	0.05	0.03	2
72	0.29	0.05	5
360	0.91	0.06	15
720	1.55	0.09	17
Fraction of >3 μm (mainly attached bacteria)			
7.2	0.07	0.01	7
72	0.53	0.04	13
360	1.50	0.05	30
720	2.33	0.03	77

Certaines activités enzymatiques, comme la protéolyse, dépendent de la présence de particules, les protéases étant des ectohydrolases (voir plus loin). Pour chaque activité bactérienne considérée, il faudra donc se référer à la constitution cellulaire et à la physiologie des bactéries. On verra ultérieurement que les bactéries libres et fixées ont des spectres d'activités hydrolytiques différents et complémentaires. L'avantage pour une cellule libre serait essentiellement d'échapper à la prédation des bactériovores et des filtrants en présentant des tailles inférieures à celles requises pour la capture des particules par ces brouteurs.

En fait, l'activité des bactéries fixées n'est pas constante au cours du temps. Peu après la colonisation d'une particule ou lors de la mise en contact d'une pelote fécale avec le milieu extérieur, les bactéries déploient une activité importante, mais diminuant assez

rapidement avec le temps. Ainsi l'activité mesurée va-t-elle dépendre, d'une certaine manière de l'âge de la particule.

2.4 Périodicité de l'activité microbienne

Dans la couche euphotique, les activités biologiques sont soumises à l'alternance du cycle jour-nuit. Les micro-organismes n'échappent pas à cette règle et l'action de la lumière se manifeste de façons multiples.

□ Le premier type d'action est purement physique. L'énergie lumineuse pénétrant les couches d'eau est responsable d'un délai (10 à 20 heures) dans le démarrage de la croissance microbienne. L'effet est maximum entre 25 et 50 % de la lumière incidente moyenne et se prolonge jusqu'à 16 % de l'intensité lumineuse de surface. Les U.V.A sont essentiellement tenus pour responsables de ce phénomène.

□ Le second type d'action est d'ordre chimique. Les produits issus des phénomènes de photo-oxydation (radical peroxyde) inhibent l'activité bactérienne. Par exemple, le CO produit par réaction sur la MOD bloque la chaîne des transporteurs d'électrons entre le cytochrome a et l'oxygène. On constate une croissance notable de l'ensemble de la population microbienne après réduction du CO.

□ Le troisième type d'action est indirect, lié aux cycles circadiens des organismes photosynthétiques et de leurs consommateurs : l'excrétion par les organismes photosynthétiques de composés polymériques ou oligomériques alimente les pools de MOD et de MOP disponibles pour les micro hétérotrophes, de même que l'excrétion et les résidus de grazing des consommateurs (débris cellulaires et contenus cytoplasmiques).

Les réponses des bactéries à l'ensemble de ces facteurs conjugués ne sont pas encore clairement définies : on a montré une augmentation de l'activité hétérotrophe en fin d'après-midi, suivie d'une augmentation de biomasse, puis d'une multiplication des effectifs dans la première moitié de la nuit. La variation des activités est évidemment modulée en fonction de la profondeur. On ne sait rien des variations nycthémerales de l'activité hétérotrophe dans les milieux aphotiques (où le signal peut être transmis par l'intermédiaire de l'excrétion des zooplanctontes effectuant des migration verticales).

2.5 L'oligotrophie et ses conséquences

2.5.1 les conditions trophiques environnementales

Pour l'océan mondial, la MOD (Matière Organique Dissoute) représente 10^{16} - 10^{18} g de C, soit 30 fois la production primaire annuelle. Paradoxalement, la concentration moyenne en MOD dépasse rarement la micromole par litre, la rendant presque inaccessible à tout autre organisme que les bactéries hétérotrophes (on connaît des exemples de "pompage" direct d'acides aminés, dans le milieu par des métazoaires, par exemple par les vestimentifères des sources hydrothermales, ou certains bivalves mais ceci reste totalement anecdotique).

Du point de vue d'une bactérie pélagique, le niveau trophique d'une eau océanique se traduit donc par sa disponibilité en matière organique utilisable. Dans la province océanique, la "richesse" de l'eau est essentiellement tributaire des ressources autochtones. En milieu néritique, des sources allochtones de MOD et MOP s'ajoutent à la production pélagique et benthique, à travers les apports terrigènes.

Relativement peu de données sont disponibles sur la qualité et les quantités de matière organique présente dans le milieu marin en général, et plus particulièrement dans les zones oligotrophes (voir tableau ci-après). Les valeurs relevées sont de l'ordre de la

micro- voire de la nanomole par litre. Ceci représente des concentrations très inférieures à celles couramment utilisées pour les milieux de culture des micro-organismes hétérotrophes (les concentrations les plus basses avoisinent la millimole par litre).

2.5.2 Adaptation des micro-organismes aux contraintes nutritionnelles du milieu océanique

En situation oligotrophe, les concentrations en substrats sont faibles et leur approvisionnement discontinu. La survie des micro-organismes est donc conditionnée à certaines adaptations que l'on peut essayer de synthétiser en relation avec

- ♦ les prélèvements de substrat,
- ♦ l'utilisation des nutriments

Tableau 2.2 : Exemples de concentrations en matières organiques dissoutes relevées dans la littérature

Eau oligotrophe : COD : 0,3-1,2 mg C.l⁻¹; NOD : 5-300 µg N.l⁻¹ (Morita, 1984)
Naragansett Bay : COD : 5,17 mg C.l⁻¹ (Burney et col., 1981)

Hydrates de carbone

Hydrates de carbone totaux : ils représenteraient 10 à 20% du COD (Burney et col., 1981)

Naragansett Bay : 849 ± 81 µg C.l⁻¹ (Burney et col., 1981)

Californie : 2,7 µM (Hagström et col., 1984)

Polymères (polysaccharides) : 655 ± 80 µg C.l⁻¹ (Burney et col., 1981)

Monomères (glucose essentiellement)

Glucose : 5-9 µg C.l⁻¹ (Gocke et col., 1981) en Mer Baltique

Glucose : 8 g C.m⁻² (Andrews et Williams, 1971), flux annuel de la Manche

Glucose : 100-600 nM suivant la profondeur (Leibzeit et col., 1980) en Mer des Sargasses

Monomères totaux : 200 ± 30 µg C.l⁻¹ (Burney et col., 1981) Naragansett Bay

Monomères totaux : 0,5 µM dans la Mer des Sargasses et 1,4 µM dans un estuaire (Mopper et col., 1980)

Composés aminés

Acides aminés totaux : Eau pélagique 6-125 µg N.l⁻¹ (Morita, 1984) et 0,95 µM (Hagström et col., 1984), au large de San Diego

Acides aminés libres dissous (DFAA)

Les DFAA représenteraient 20 à 34% du carbone organique excrété (Jørgensen, 1982)

Estuaire au Danemark : 700-2500 nM au printemps et à l'automne, 200 nM en été et en hiver (Jørgensen, 1982)

Front d'Ushant (Manche) : 200-300 nM (Poulet et col., 1984)

Le flux de DFAA, en Colombie Britannique, serait de 0,09 à 2,42 µM.j⁻¹ (Hollibaugh et col., 1980), en Manche : 60 g C.m⁻².an⁻¹ (Andrews et Williams, 1971)

AA libres dissous individuels

Eau pélagique : 0-40 nM par AA (Clark et col., 1972 ; Daumas, 1976)

Eau oligotrophe : 0-38 µg N.l⁻¹ par AA (Morita, 1984)

Mer des Sargasses : 22 à 30 nM maximum par AA dans les 100 premiers mètres (Leibzeit et col., 1980)

Acides aminés combinés dissous

Eau équatoriale de surface : 40 à 50 nM par AA (Lee et Bada, 1975)

Les adaptations liées au **prélèvement du substrat** dans le milieu naturel sont :

- ☐ Le rapport surface/volume de la cellule doit être élevé. En général, les cellules sont petites et/ou allongées (on a mis en évidence la réalité de micro bactéries actives et d'appendices accroissant la proportion de sites de capture et diminuant le trajet de la diffusion vers les sites internes d'utilisation.
- ☐ Le métabolisme énergétique est dévolu essentiellement au prélèvement des nutriments. Une forte proportion de l'ATP généré par le métabolisme endogène est consommée pour le prélèvement, la possession de donneurs d'électrons spécifiques, rapidement mobilisables, permet l'établissement d'un gradient de protons pour le transport.
- ☐ La capacité d'uptake est constante : il y a peu de cellules dormantes imperméables aux nutriments ou incapables à réaliser un transport.
- ☐ Les systèmes d'uptake sont à forte affinité et il y a possibilité de prélèvement simultané de substrats variés.
- ☐ Le prélèvement conduit à l'accumulation de réserves, la vitesse de croissance est relativement lente.

Les caractéristiques de l'**utilisation des nutriments** et leurs conséquences pour le modèle oligotrophe sont alors :

- ☐ Une vitesse faible de métabolisme endogène : la viabilité sera prolongée en l'absence d'apport exogène de nutriments.
- ☐ Une réponse du métabolisme général relativement lente à un enrichissement, l'augmentation lente de la vitesse du métabolisme jusqu'à un seuil permettant les biosynthèses ne pouvant se faire que lorsque les systèmes d'uptake et les pools métaboliques sont saturés.
- ☐ Les vitesses d'uptake et d'accumulation demeurent élevées même lorsque la concentration diminue, par contre, la vitesse des biosynthèses décroît rapidement.
- ☐ Une large versatilité catabolique
- ☐ Une forte proportion des enzymes cataboliques sont inductibles (v. plus loin), alors que les systèmes transporteurs sont constitutifs.
- ☐ La répression catabolique est maintenue au niveau minimal, permettant l'utilisation simultanée de plusieurs sources de carbone et d'énergie.
- ☐ La capacité à emmagasiner une variété de matériel de réserve en consacrant une part importante du volume cellulaire au stockage (ce qui permet la croissance par enrichissement d'un seul substrat).

En fait, ce n'est que rarement que les bactéries des systèmes oligotrophes possèdent simultanément la totalité de ces caractéristiques. Les communautés microbiennes sont caractérisées par des indices de diversité élevés (de l'ordre de 3 à 4 pour l'indice de Shannon) et les différentes souches présentes, les écotypes, ont des potentialités métaboliques équilibrées entre l'utilisation des composés de faible poids moléculaire (monomères, oligomères, ...substrats directs) et les polymères (nécessitant des équipements en ectoenzymes, v. plus loin). La stabilité de ces communautés est due à l'étendue des potentialités cataboliques exercées par la somme des différents individus la composant. Par ailleurs, même à des concentrations inférieures à la nanomole, les cinétiques d'uptake peuvent être multiphasiques (plusieurs V_{max}) pour des écotypes différents d'une même communauté, d'où l'adaptation rapide à différentes gammes de concentrations de substrats.

2.5.3 Oligotrophie : mythe ou réalité ?

La situation oligotrophe est essentiellement le fait de l'océan ouvert, loin de l'influence des apports terrigènes. La MOP non vivante est rapidement hydrolysée par les bactéries (v. plus loin). Cette hydrolyse, réalisée en quelques jours pour la fraction labile, crée de nouvelles sources de MOD.

La MOD provient souvent d'une particule ou d'un organisme qui peut être physiquement assimilé à une particule. Dans l'espace cela se traduit, à partir d'un point source, en champs nutritifs structurés dans le microenvironnement bactérien. Les gradients épisodiques se dissipent par diffusion moléculaire en quelques secondes ou quelques minutes. Il y aurait ainsi une concentration de base de la MOD, de l'ordre de la nanomole par litre, en fonction du taux d'excrétion des organismes planctoniques, avec des "flashes" de concentration beaucoup plus élevés (de l'ordre de la micromole) dus à des actions ponctuelles comme l'éclatement des cellules lors du broutage. C'est à l'occasion de ces augmentations très limitées dans le temps (minutes) et dans l'espace (μm) de la fraction labile de la MOD que les bactéries hétérotrophes déploieraient une activité d'assimilation et de production. En situation côtière semi-oligotrophe, on peut calculer que, dans un cube de 1 mm de côté, renfermant une cellule algale et 10^3 bactéries, il faudrait, théoriquement 25 sec à une bactérie nageant à une vitesse de $20 \mu\text{m sec}^{-1}$ pour parcourir les 500 μm qui la séparent du point source de matière organique. Des laps de temps si brefs permettent un pompage efficace de la MOD.

Les phénomènes de chimiotactisme vont leur permettre de se rapprocher de la source d'émission, lorsqu'elles circulent dans le champ de perception du composé chimique. Grâce à ce processus, les bactéries ne seront plus distribuées de manière aléatoire dans l'espace, leur distribution relèvera de l'hypothèse de distribution en un environnement structuré en fonction du gradient nutritionnel (Théorie d'Azam et Ammerman).

En situation encore plus oligotrophe, les cellules algales et bactériennes seront moins nombreuses, les temps nécessaires à la rencontre entre les bactéries et les sources de matière organique seront plus longs. De ce fait, la probabilité pour les bactéries de se retrouver dans la microzone enrichie sera plus faible. Il reste encore à déterminer si, in situ, ces bactéries développent une activité de type oligotrophe, mais constante, ou, au contraire, si l'activité se réalise de manière épisodique, uniquement dans des conditions de concentration en substrat supérieures à celles de l'oligotrophie. Selon toute probabilité ces deux types doivent coexister dans le milieu naturel.

2.6 Etude des activités enzymatiques de dégradation

2.6.1 Ecto-, exo- et endohydrolases

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protidique qui interviennent dans toutes les réactions métaboliques énergétiquement possibles, qu'elles accélèrent par activation spécifique. La gamme d'activité de l'enzyme s'établit sur une plage de températures et de pH limitée. Les classes d'enzymes qui nous intéresseront le plus dans la suite sont les **oxydases** et surtout les **hydrolases**. Les oxydases catalysent les réactions d'oxydoréduction : transfert d'hydrogène ou d'électron(s) d'un donneur, qui est oxydé, vers un accepteur, qui est réduit. Ces enzymes interviendront notamment dans les processus d'ouverture des cycles benzéniques. Les hydrolases provoquent la coupure de divers types de liaisons avec incorporation d'une molécule d'eau : ester, acétal, amide, ... les sous-classes sont définies par la nature générale de la liaison hydrolysée. Ces enzymes sont les principaux agents de la biodégradation des molécules naturelles (protéines, polysaccharides, lipides, acides nucléiques, ...).

L'étude des activités hydrolytiques par des écologistes d'une part et des biochimistes d'autre part, si elle a fait avancer fortement la connaissance de ces activités et les

méthodologies de travail, a aussi introduit pas mal de confusion. Les *exo-* et *endohydrolases* des écologistes et des biochimistes ne recouvrent pas la même réalité. Dans le domaine océanographique, un certain consensus semble apparaître à propos des définitions suivantes :

□ Les termes *exo-* et *endohydrolases* sont réservés à la définition du **mode d'attaque des substrats**, quelque soit l'endroit (intra- ou extracellulaire) de cette activité. Les **exohydrolases** sont spécifiques de l'hydrolyse des polymères dont ils "retiennent" un monomère de bout de chaîne. Par exemple les aminopeptidases, hydrolysent l'AA terminal d'une chaîne polypeptidique en commençant par l'extrémité $-NH_2$, les carboxypeptidases, par l'extrémité $-COOH$. L'hydrolyse par ces enzymes libère donc un monomère (l'AA terminal) et un polymère (le reste de la chaîne). Les **endohydrolases** hydrolysent le substrat en coupant en milieu de chaîne. Par exemple la α -chymotrypsine (E.C.3.4.21.1) hydrolyse les protéines en coupant la liaison peptidique où un AA aromatique est engagé par son groupement carboxyle. Cette activité résulte en la production de deux chaînes polypeptidiques (de part et d'autre de la coupure).

□ Le site d'activité des enzymes peut être défini également : on parlera d'**enzymes intracellulaires**, **extracellulaires** (libérés dans le milieu extérieur, enzymes libres, solubles) et d'**ectoenzymes** (enzymes extérieurs à la cellule mais fixés à la membrane cellulaire, éventuellement dans le "périplasma") (Fig. 2.4). Les ectoenzymes, bien que structurellement liés à la cellule, ont une position intermédiaire : ils constituent un "pont" entre les substrats extérieurs à la cellule et le cytosol en intervenant, avec les perméases, dans le transport des produits de la réaction (monomères = substrats directs) vers l'intérieur de la cellule. Toutefois, situé au dehors, ils ont des susceptibilités d'inhibition (ou d'activation) par des molécules du milieu ambiant, tout comme les enzymes "libres".

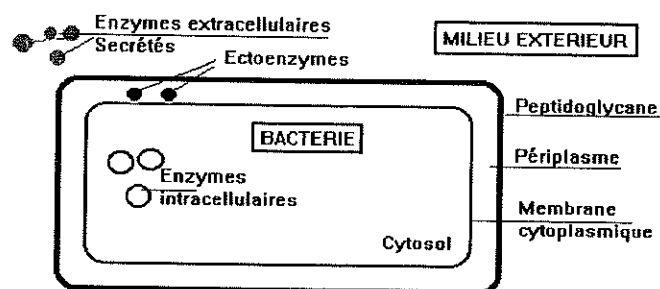


Fig. 2.4 : Terminologie relative aux activités enzymatiques hydrolytiques.

En fait, l'essentiel des activités hydrolytiques se passe à l'extérieur de la membrane plasmique, par l'intermédiaire d'enzymes libres (sécrétés) ou d'ectoenzymes. Le passage de la phase liée (ectoenzyme) à la phase soluble est possible en fonction des phases de croissance de cultures microbiennes *in vitro* ou en fonction des conditions de ces cultures. Certaines activités enzymatiques peuvent même être rencontrées dans les trois compartiments à la fois : on connaît chez les *Bacillus* une forme de phosphatase alcaline (E.C.3.1.3.1) liée à la membrane et une forme soluble. Les enzymes liés à la face interne de la membrane sont aisément extraits par des solutions salines (pool intracellulaire), tandis que ceux fixés à la face externe de la membrane ne peuvent être extraits que par des solutions détergentes (ectoenzyme). Enfin une phosphatase alcaline soluble peut passer la membrane cellulaire et le périplasma et être excrétée sous forme "libre". Il n'y a pas de différence significative quant aux propriétés physico-chimiques de ces trois formes (Fig. 2.5).

La question de savoir sous quelle "forme" sont actifs les principaux enzymes hydrolytiques a mis longtemps à s'éclaircir. En fait, il semblerait que les bactéries Gram⁻ (les plus abondantes dans le milieu marin), avec leur paroi multicouche, "relâchent" peu d'enzymes périplasmiques dans le milieu extérieur, à l'inverse des bactéries Gram⁺, ou d'autres micro-organismes dépourvus de l'une ou l'autre couche de la paroi.

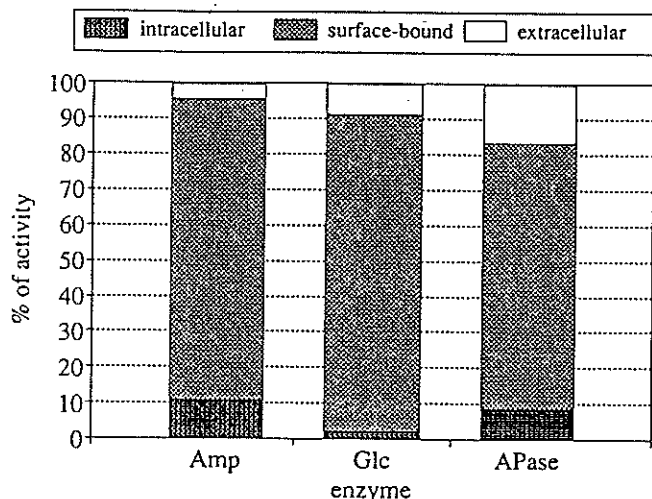


Fig. 2.5 : Distribution des différents pools d'activités enzymatiques dans les compartiments intra- et extracellulaire.

Amp : aminopeptidase ; **Glc** : β -glucosidase ; **APase** : phosphatase alcaline

Au contraire de ce qui a été observé dans le cas des phosphatases, la filtration différentielle des échantillons avant les mesures d'activité enzymatique (fig.2.6) montre que l'essentiel (70 à 100 %) des activités protéolytiques et glucosidasiques non intracellulaires est lié à des particules de tailles comprises entre 0.2 et 2.0 μ m (endo- et exopeptidases, glucosidase, galactosidase, ...). La similarité entre le schéma de fractionnement de taille de l'activité protéolytique et de l'activité bactérienne proprement dite démontre que l'activité enzymatique est liée aux bactéries elles-mêmes. La destruction des cellules par sonication libère des fragments d'enveloppe bactérienne auxquels les enzymes protéolytiques restent attachés. Seul le traitement par le Triton X-100 ou le SDS (détergents) connus pour solubiliser la paroi et la membrane bactérienne, ou un complexe EDTA-lysozyme avec les mêmes propriétés aboutit à libérer une partie importante de l'activité protéolytique sous une forme soluble (non centrifugeable) (Fig 2.7).

Les bactéries Gram positives ont une paroi relativement simple : la membrane cellulaire est doublée extérieurement d'une enveloppe d'un complexe de peptidoglycane et d'acide teichoïque ou teichuronique sous forme d'une matrice mixte. On n'y décèle généralement pas de structure lamellaire. Cet ensemble est hautement perméable. Les bactéries Gram négatives ont une paroi complexe. Le peptidoglycane n'est pas fermement adhérent à la membrane cellulaire comme chez les bactéries Gram positives. Leur caractéristique principale est d'avoir une seconde enveloppe, extérieure au peptidoglycane. Cette enveloppe constitue une barrière rendant les cellules moins perméables à une grande diversité de composants que celles des Gram⁺. L'espace périplasmique constitue 20 à 40 % du volume total de la cellule, où l'on trouve les ectoenzymes et d'autres types de protéines susceptibles d'immobiliser les substrats polymériques.

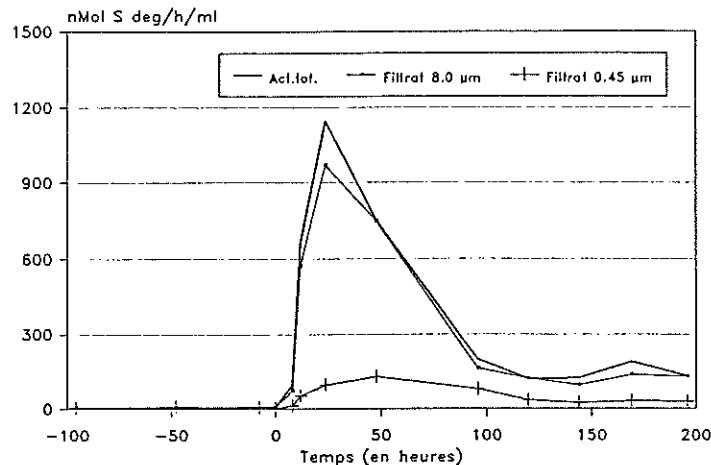


Fig. 2.6 : Réponse à un enrichissement en protéines (caséine 50 mg/l) d'une population naturelle de bactéries.

L'inoculation a été effectuée au temps 0. Elle induit une augmentation très rapide de l'activité protéolytique de la suspension globale ou du filtrat à 8.0 µm (bactéries et ectoenzymes), alors que le filtrat à 0.45 µm montre une activité très basse (enzymes libres).

Ces résultats montrent que l'essentiel de l'activité protéasique des échantillons d'eau naturelle est lié structurellement aux enveloppes bactériennes, plutôt que d'être excrété sous forme d'enzymes libres dans le milieu extérieur. La faible fraction (0 - 10%) de l'activité protéasique qui passe un filtre de 0.2 µm est associée à des particules de taille moléculaire apparente > 100000 d et correspond vraisemblablement à des fragments cellulaires provenant de la lyse des bactéries, plutôt qu'à des enzymes libres directement et activement excrétés.

Des essais de fractionnement montrent que de 75 à 85 % de l'activité enzymatique totale (aminopeptidase, β -glucosidase et phosphatase alcaline) est associée aux membranes bactériennes sous forme d'ectoenzymes (Fig. 2.5). Les activités des pools intracellulaires et sécrétés dans le milieu sont très basses. Les activités intracellulaires contribuent de 2 (β -glucosidase) à 8 % (aminopeptidase) à l'activité globale mesurée. Les activités des enzymes libres représentent 3 (aminopeptidase) à 18 % (phosphatase alcaline) de l'ensemble.

Comment interpréter l'existence de ces deux pools enzymatiques, libres et liés aux cellules, sous l'angle de l'écologie ?

Les enzymes sécrétés dans le milieu ambiant sont très exposés à la biodégradation (présence de protéases !) et à divers types d'altération chimique (par exemple, inactivation par les acides humiques, v. plus loin). L'activité des enzymes s'en trouve considérablement réduite. Il peut apparaître peu efficace, sur un plan énergétique, de synthétiser puis de relâcher des enzymes à une distance importante du site d'utilisation métabolique des produits de la réaction. La probabilité, pour une cellule de pouvoir utiliser le produit de la réaction décroît très rapidement en fonction de l'éloignement de ce produit. Toutefois, si la molécule hydrolysée est dans un rayon de moins de 500 µm environ, la probabilité d'absorption est suffisante pour justifier la libération de l'enzyme.

A l'inverse, les enzymes fixés à la membrane cellulaire rencontrent des problèmes de diffusion dans la couche limite au contact de la cellule. La diffusion des substrats jusqu'aux enzymes "liés" est relativement lente, et la concentration de ces substrats peut être encore plus basse dans le microenvironnement de l'interface cellulaire que dans le macroenvironnement (Fig. 2.8).

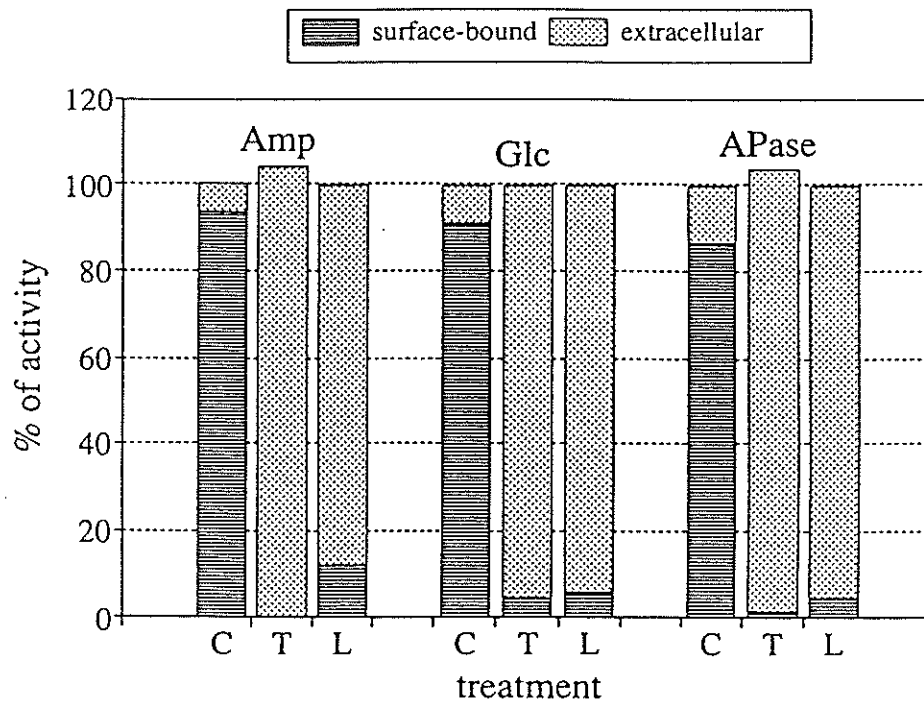


Fig. 2.7 Distribution des activités enzymatiques associées aux membranes bactériennes (surface-bound) et extracellulaires. Effet d'un traitement par le Triton X-100 [T] et le complexe EDTA-lysozyme [L] par rapport à un témoin non traité [T]. Mêmes abréviations que figure précédente.

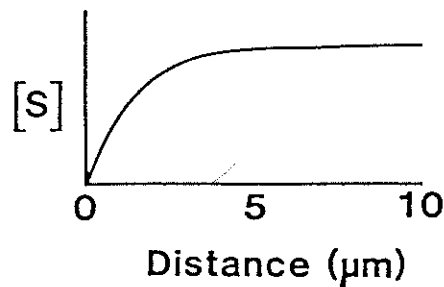


Fig 2.8 : Avantage potentiel de la sécrétion d'enzymes libres par rapport aux ectoenzymes du point de vue de la concentration de substrats directement accessibles. [D'après le modèle de Engasser et Horvath]

L'établissement de gradients d'uptake pourraient favoriser la diffusion, mais le calcul montre que cet effet est insuffisant et la "résistance diffusionnelle" peut provoquer à la fois une déplétion en substrat hydrolysable et une accumulation de produits de la réaction (éventuellement inhibiteurs). Pour pallier ce problème, la stratégie de libération des enzymes dans l'environnement peut s'avérer rentable. Les pertes liées à la diffusion des produits de la réaction à distance trop importante de la cellule peuvent être compensées par un meilleur accès aux substrats. De plus, du point de vue du fonctionnement de l'écosystème, ces produits peuvent être utilisés par d'autres organismes, bactériens ou végétaux. Toutefois, l'association étroite des ectoenzymes avec la cellule autorise une modulation fine de la synthèse et de l'activité de ces hydrolases (induction) et un meilleur

couplage entre hydrolyse et uptake. L'avantage est maximal dans le cas des exohydrolases, en association étroite avec les perméases sous forme de complexes fonctionnels.

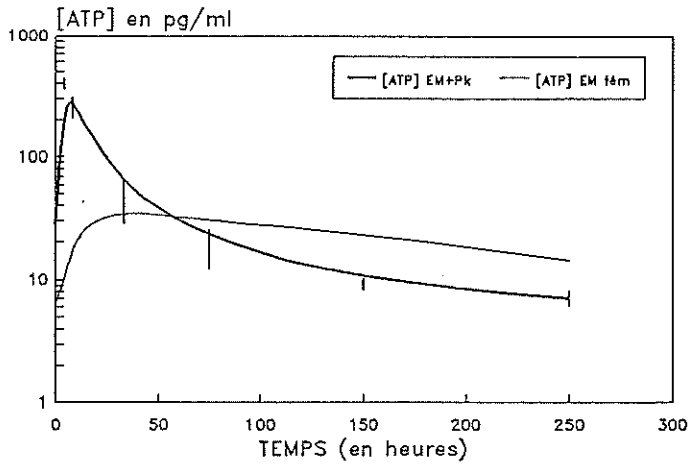


Fig. 2.9 Augmentation de la biomasse microbienne exprimée en ATP lors de l'enrichissement d'une culture en caséine (10 mg/l)

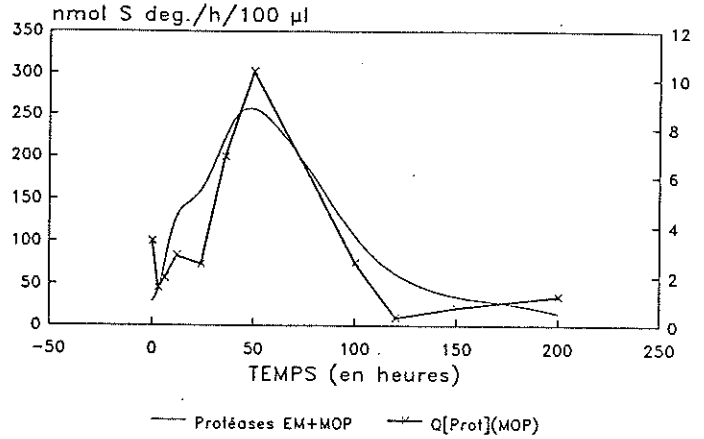


Fig. 2.10 Activité protéolytique et quotient protéasique (activité par bactérie) après enrichissement du milieu.

Diverses expériences d'enrichissement d'eau naturelle en protéines ou en acides aminés ont été réalisées, afin de mettre en évidence d'éventuels effets de régulation de la synthèse des protéases par les bactéries (Fig. 2.9 et 2.10). Dans ces expériences, le taux différentiel d'augmentation de l'activité protéolytique par rapport au nombre de bactéries est environ 10 fois plus élevé sur albumine ou caséine que sur acides aminés. Il atteint des valeurs de 0.55 à 2.2 Unités Enzymatiques/µg C bact dans le cas des cultures sur albumine seule, et de 0.055 à 0.17 UE/µg C bact dans le cas des cultures sur acides aminés.

Dans les eaux de mer naturelles cependant, le rapport de l'activité protéolytique à la biomasse bactérienne est très constant (Fig. 2.11) et se situe à une valeur intermédiaire (0.44 UE/µg C bact). Ceci suggère que les processus de régulation au niveau de la bactérie sont peu importants dans les conditions naturelles, du moins en ce qui concerne une activité de dégradation de substrats aussi abondants et constants que les protéines. A l'inverse, l'induction enzymatique est fondamentale dans le cas des substrats moins largement répandus ou à distribution cyclique.

CHROST a proposé un modèle justifiant les relations de répression/activation des activités hydrolytiques (Fig. 2.12). Ce modèle prend en compte la MOD polymérique (impliquant une hydrolyse préalable à son utilisation) et l'UDOM ("utilizable dissolved organic matter", ou substrats directs susceptibles d'être absorbés sans transformation). Au début des blooms phytoplanctoniques, les végétaux sécrètent une abondance d'UDOM (monosaccharides, AA, ...) qui ont une activité inhibitrice sur l'activité hydrolytique (inhibition par un produit de la réaction) et répriment la synthèse des ectoenzymes chez les bactéries hétérotrophes. Les algues vieillissantes relâchent des métabolites de second ordre ou s'autolysent, libérant de la MOD polymérique (protéines, polysaccharides, ...). Des teneurs basses en UDOM et élevées en MOD polymérique dérèglent le processus, induisent la synthèse et activent les hydrolases.

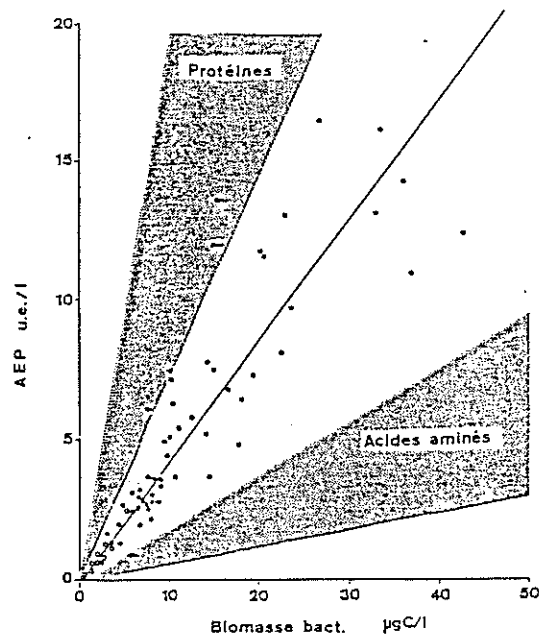


Fig. 2.11 Relation observée entre l'activité protéolytique (AEP) et la biomasse bactérienne dans des échantillons d'eau de la mer du Nord (●) et de l'océan Antarctique (○). Les zones grisées représentent la relation observée dans des cultures enrichies en AA et en protéines respectivement.

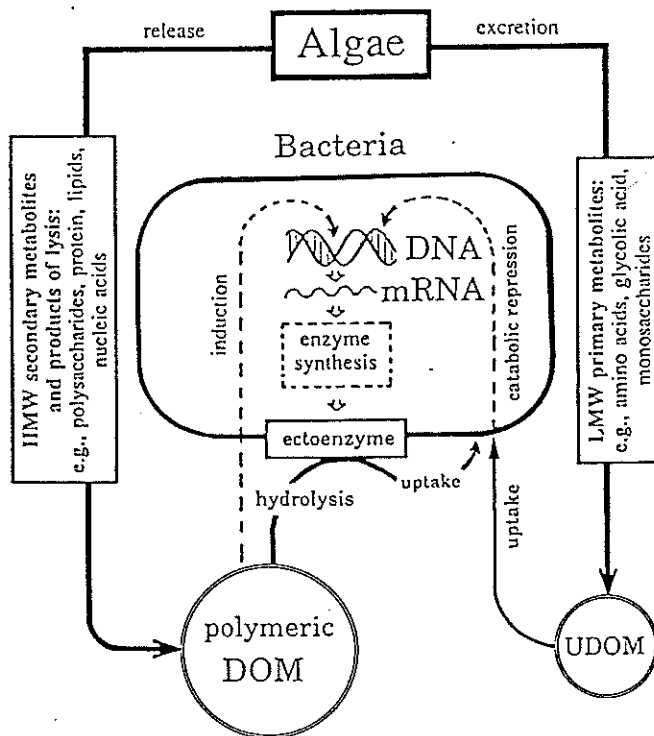


Fig. 2.12 Modèle conceptuel des interactions bactériennes avec les substrats directement utilisables (UDOM) et la MOP polymérique avec le mécanisme de régulation des activités ectoenzymatiques

Ce processus permet l'optimisation de la dégradation des substrats en minimisant l'investissement énergétique de synthèse des hydrolases. L'environnement nutritionnel permet ainsi un ajustement précis de la synthèse des hydrolases nécessaires, du moins en ce qui concerne les enzymes inductibles (la plupart des ectoenzymes).

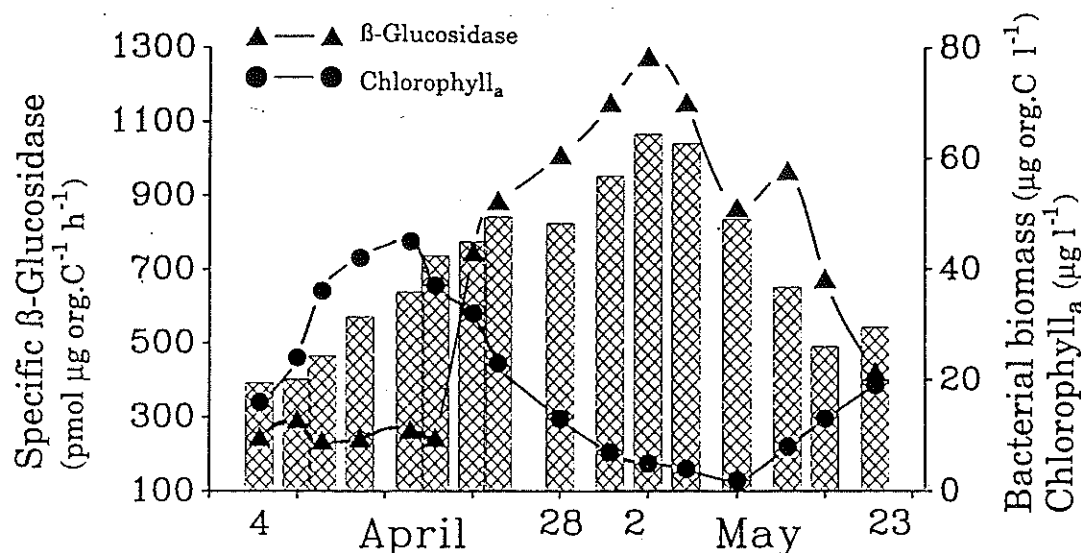


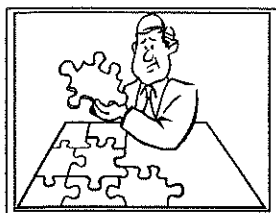
Fig 2.13 Activité spécifique de la β -glucosidase (pmol S deg/min/ $\mu\text{g C org bactérien}$) corrélée au développement d'un bloom phytoplanctonique ($\mu\text{g chlorophylle/l}$). Les biomasses bactériennes sont représentées par les barres verticales

La figure 2.13 illustre ce phénomène d'induction enzymatique dans le cas de la β -glucosidase corrélat les activités enzymatiques aux substrats hydrolysables par synchronisation avec le développement d'un bloom phytoplanctonique.

Durant le bloom phytoplanctonique printanier, la V_{max} spécifique de βGlc présente une évolution temporelle nette. L'activité de βGlc est basse pendant la première phase du bloom, lors de la croissance rapide des algues (moyenne $255 \pm 22 \text{ pmol} / \mu\text{g C org} / \text{h}$). L'activité spécifique de l'enzyme augmente progressivement dès l'arrêt de la croissance algale pour atteindre sa valeur maximale ($1147 \pm 132 \text{ pmol} / \mu\text{g C org} / \text{h}$) lors de la lyse des phytoplanctontes. L'augmentation de l'activité β -glucosidasique est proportionnelle à l'augmentation de biomasse et de production bactériennes.

Cette variation temporelle résulte de phénomènes complexes d'induction/ répression, modulées par l'action d'activateurs et d'inhibiteurs altérant les cinétiques.

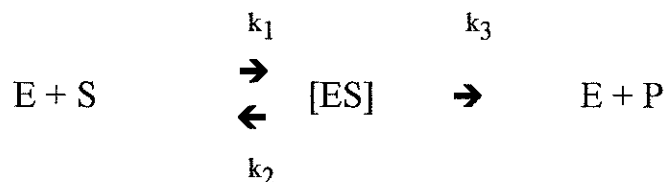
2.6.2 Altération des cinétiques enzymatiques



REMARQUE : les données suivantes relatives aux généralités quant aux cinétiques enzymatiques sont données à titre documentaire pour les étudiants n'ayant pas vu ces notions lors de leurs études précédentes.

Les trois principaux faits expérimentaux à la base des lois générales de la cinétique enzymatique sont :

- ❑ Le substrat S forme avec l'enzyme E un *complexe intermédiaire transitoire ES*
- ❑ Pour une concentration donnée en S, la *vitesse de la réaction dépend de la concentration en E*. Au delà d'une certaine concentration en E, la vitesse ne varie plus, tout le S étant sous forme du complexe ES (courbe d'allure hyperbolique).
- ❑ La *vitesse de la réaction* (apparition du produit) *évolue au cours du temps* suite à la disparition du substrat. Cette vitesse peut être considérée comme constante au début de la réaction (vitesse initiale) et évolue vers une vitesse maximale stable sous forme d'un plateau (V_{max}). En phase initiale, la concentration en produit P est très faible, de même que la réaction de transformation de produit en substrat. On peut donc écrire :



Hypothèse de **Michaelis et Menten** : la vitesse de transformation de [ES] en E+P est très lente par rapport à la vitesse de rupture de [ES] redonnant E+S. On aurait donc $k_3 \ll k_2$ et donc E et [ES] seraient à l'équilibre soit :

$$k_1 [E] [S] = k_2 [ES] \quad \text{avec} \quad K_m = k_2 / k_1$$

Selon **Briggs et Haldane**, cette hypothèse est trop restrictive. Il est préférable de postuler un état stationnaire pour lequel la vitesse de formation de [ES] est égale à sa décomposition dans les deux directions. On a donc :

$$\text{Vitesse de formation de } [ES] = k_1 [E] [S]$$

$$\text{Vitesse de disparition de } [ES] = k_2 [ES] + k_3 [ES] = (k_2 + k_3) [ES]$$

L'état stationnaire s'écrit donc :

$$k_1 [E] [S] = (k_2 + k_3) [ES] \text{ d'où } [E] = (k_2 + k_3) / k_1 [ES] / [S]$$

$$\text{avec } K_m = (k_2 + k_3) / k_1$$

En écrivant que la quantité d'enzyme dans le milieu $[Et]$ se répartit en une fraction libre $[E]$ et une fraction complexée $[ES]$, on a $[Et] = [E] + [ES]$.

En remplaçant $[E]$ par sa valeur dans l'équation de l'état stationnaire, et puisque la vitesse de formation du produit est donnée par $v = k_3 [ES]$, l'équation générale est de la forme

$$v = \frac{k_3 [Et] [S]}{(k_2 + k_3)/k_1 + [S]}$$

Quand la concentration en S devient infinie, la vitesse initiale tend vers $k_3[Et]$, c'est la vitesse maximale (toute l'enzyme se trouve sous la forme $[ES]$). L'équation générale devient donc :

$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$

C'est l'équation de MICHAELIS et MENTEN selon laquelle la vitesse de la réaction enzymatique est une fonction hyperbolique de la concentration de substrats.

V_m représente la vitesse maximale que peut atteindre la réaction ; lorsque la vitesse de la réaction atteint la moitié de la vitesse maximale ($v = 1/2 V_m$), K_m , la *constante de Michaelis* (qui représente la constante d'équilibre pour la dissociation de $[ES]$), est alors égale à $[S]$. La représentation cinétique selon Michaelis et Menten, où v est porté en fonction de $[S]$ est reprise à la Fig. 2.14

La constante de Michaelis, K_m , est très importante pour l'étude des cinétiques enzymatiques. En effet, elle est une mesure de l'affinité de l'enzyme pour son substrat : plus l'interaction E-S est forte, plus il y aura d'enzyme combiné à son substrat sous la forme $[ES]$ et moins il y aura d'enzyme libre. Donc $[E]$ sera petit et $[ES]$ grand, par conséquent K_m sera petit. *L'affinité d'un enzyme pour son substrat sera, par définition, égale à $1/K_m$. Si K_m est petit, l'affinité est grande ; si K_m est grand, l'affinité est faible.*

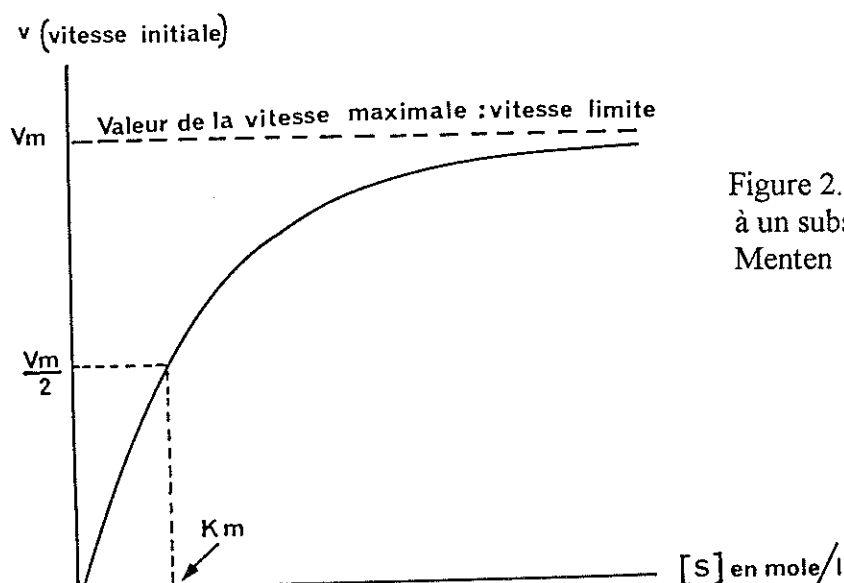


Figure 2.14 : Cinétique enzymatique à un substrat selon Michaelis et Menten

Le K_m sera important pour l'étude des activités inhibitrices et activatrices des enzymes. Toutefois, la difficulté de tracer avec précision l'asymptote à la courbe, et par suite, de déterminer graphiquement V_m et K_m , a conduit **Lineweaver et Burke** à proposer un mode de représentation linéaire.

L'équation de Michaelis et Menten devient :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_m [S]} \quad \text{ou encore} \quad \frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]}$$

Cette nouvelle équation montre une relation linéaire entre $1/v$ et $1/[S]$, ce qui conduit à la représentation graphique de la figure 2.15. Si on porte la valeur de $1/v$ en fonction de $1/[S]$, on obtient une droite qui coupe l'axe des ordonnées à la valeur $1/V_m$ et l'axe des abscisses à la valeur $-1/K_m$. La pente de cette droite est égale à K_m/V_m . Ainsi cette représentation est-elle beaucoup plus commode pour la détermination de la constante de Michaelis, K_m et de la vitesse maxima (V_m).

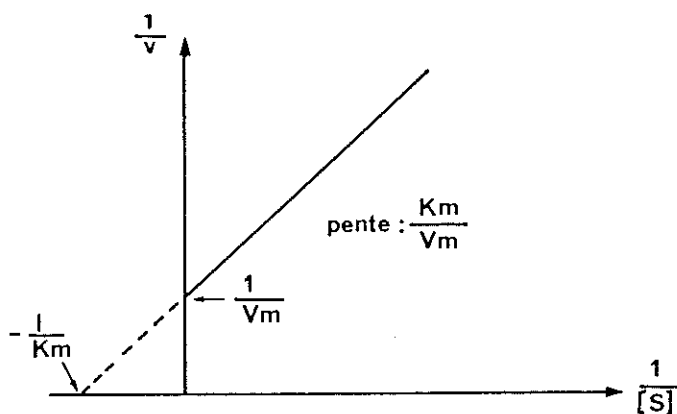


Fig. 2.15 Cinétique enzymatique à un substrat selon Lineweaver et Burke

La vitesse d'une réaction enzymatique et donc l'activité enzymatique telle qu'on la mesure dans un contexte écologique, peut être modifiée par la présence de composés autres que le substrat : il s'agit des effecteurs. Ils jouent un rôle important dans les phénomènes de régulation métabolique et écologique des activités enzymatiques. On peut classer les effecteurs en deux groupes, les activateurs (qui augmentent la vitesse des réactions) et les inhibiteurs (qui la réduisent).

□ Inhibition compétitive

L'inhibiteur est une substance de structures chimique et spatiale analogues au substrat et qui vient se loger sur le site actif de l'enzyme, empêchant la fixation du substrat (Fig.2.16).

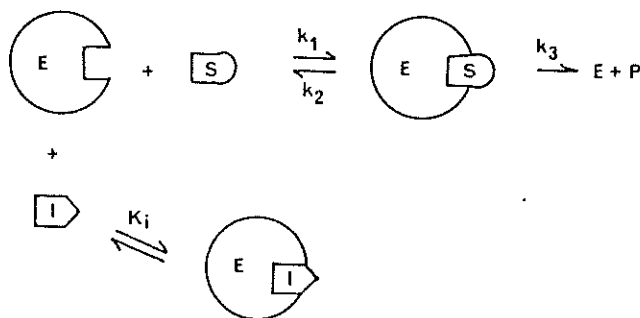


Fig. 2.16 Schéma conceptuel de l'inhibition compétitive

L'association enzyme-inhibiteur est exclusive. On peut montrer que dans ce cas (Fig. 2.17), la V_m n'est pas modifiée par la présence d'inhibiteur (la compétition substrat-inhibiteur pour le site de fixation est en faveur du substrat dès que sa concentration est suffisamment élevée). Par contre la constante apparente K'_m en présence d'inhibiteur est plus grande que K_m (moins d'affinité).

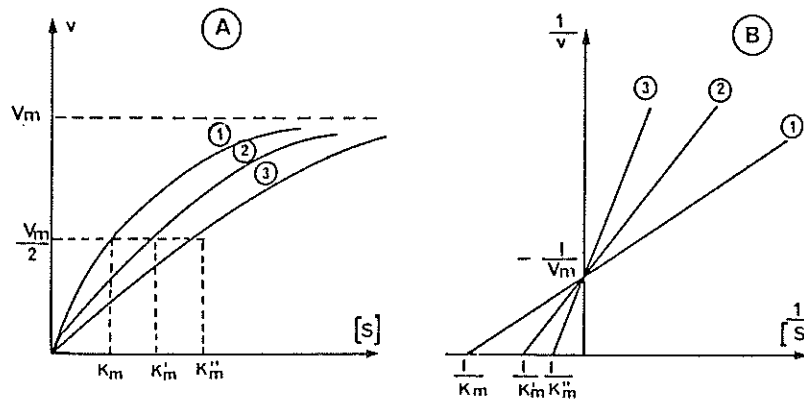


Fig. 2.17 Inhibition compétitive.

Représentations selon Michaelis et Menten (A)

et selon Lineweaver et Burke (B) : 1) sans inhibiteur $[I]=0$

2) avec inhibiteur $[I_1]$

3) avec inhibiteur $[I_2] > [I_1]$

On a

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad \text{et donc} \quad v = \frac{V_m [S]}{K_m (1 + [I]/K_i) + [S]}$$

ou encore

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]}$$

Des cas d'inhibition compétitive sont fréquents dans le contexte écologique marin. C'est notamment par ce biais que s'effectue une partie des échanges d'informations entre membres différents des communautés microbiennes, et c'est la voie principale d'action des répresseurs du développement (lutte biologique). Un organisme peut sécréter un inhibiteur compétitif d'une enzyme indispensable à un "concurrent" alors que lui-même dispose d'autres voies métaboliques (c'est le principe d'action des sulfamides et des antibiotiques au sens large).

□ Inhibition incompétitive

C'est une inhibition par blocage du complexe $[ES]$ (Fig. 2.18). On suppose, sur l'enzyme, l'existence de deux sites de fixation, l'un pour le substrat, l'autre pour un éventuel inhibiteur, mais ce dernier ne pouvant se fixer qu'après formation du complexe ES .

L'association n'est pas exclusive. L'inhibiteur bloque la réaction au stade du complexe [ESI] qui ne peut évoluer. Phénomène rare dans le contexte écologique qui nous occupe, nous ne l'évoquerons pas plus avant.

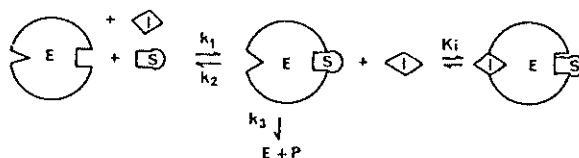


Fig. 2.18 Schéma conceptuel de l'inhibition incompétitive

□ Inhibition non-compétitive

L'inhibiteur se lie indifféremment à l'enzyme libre ou au complexe [ES] sur un site qui lui est propre (Fig.2.19). Ici encore l'association est de type non exclusif. Comme dans l'inhibition incompétitive, le complexe ESI ne peut donner naissance au produit de la réaction.

En supposant les [EI] et [ESI] à l'équilibre, les constantes d'équilibre (K_i) de la fixation de I sur E et de I sur ES égales, et l'état stationnaire pour [ES], on peut montrer que l'équation des vitesses s'écrit :

$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} * \frac{1}{1 + [I]/K_i}$$

ou encore

$$\frac{1}{v} = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \left(\frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]}\right)$$

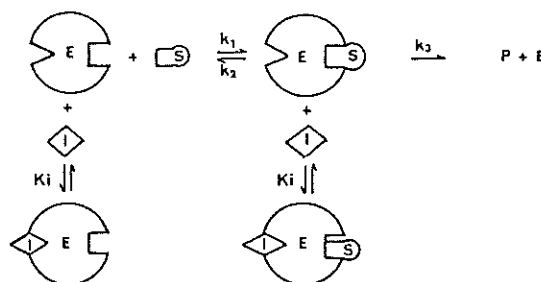


Fig. 2.19 Schéma conceptuel de l'inhibition non-compétitive

Dans ce type d'inhibition, la vitesse maximale diminue tandis que K_m reste inchangé, ce qui se traduit, dans la représentation de Lineweaver et Burke, par un faisceau de droites coupant l'axe des abscisses en $-1/K_m$ (Fig. 2.20).

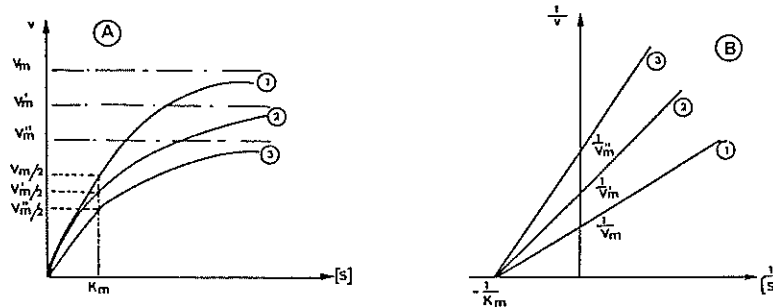


Fig. 2.20 : Inhibition non compétitive. Représentations selon Michaelis et Menten (A) et selon Lineweaver et Burke (B).

- 1) sans inhibiteur $[I]=0$
- 2) avec inhibiteur à la concentration $[I_1]$
- 3) avec inhibiteur à la concentration $[I_2] > [I_1]$

Ce type d'inhibition est très largement répandu dans le contexte écologique. Il permet l'optimisation des processus d'hydrolyse et d'uptake en fonction de la composition du milieu. De nombreuses petites molécules organiques sont ainsi des effecteurs efficaces d'enzymes diverses qui contrôlent le métabolisme des micro-organismes présents. Des exemples seront envisagés ultérieurement (composés phénoliques pour les protéases, AA pour la β Glc, ...).

□ Enzymes allostériques

Toutes les enzymes ne sont pas de type michaelien. En effet, certaines d'entre elles n'obéissent pas à la cinétique "classique" : si l'on porte v en fonction de $[S]$, la courbe obtenue n'est pas hyperbolique mais sigmoïde (Fig. 2.21).

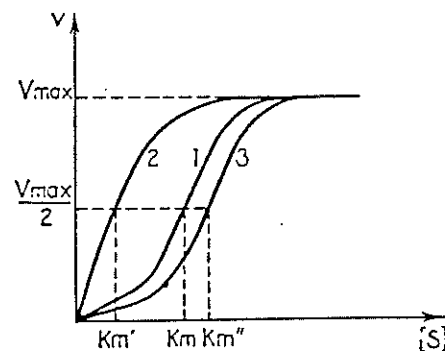
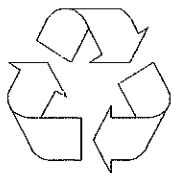


Fig. 2.21 Cinétique d'une réaction catalysée par une enzyme allostérique.

- 1) en l'absence d'effecteurs
- 2) en présence d'un activateur allostérique
- 3) en présence d'un inhibiteur allostérique

Cette courbe sigmoïde traduit un effet coopératif, deux molécules (au moins) de S interagissent avec E , et la fixation de la première facilite la fixation de la deuxième. De même dans le cas des effecteurs allostériques, activateurs ou inhibiteurs. Étant donné l'aspect sigmoïde de la courbe cinétique, on a affaire ici à un *effet de seuil* : au dessous de ce seuil, l'augmentation de $[S]$, $[I]$ ou $[A]$ ne se traduit pas par un effet notable sur la vitesse. Mais au delà du seuil, la vitesse varie beaucoup pour une augmentation de $[S]$,

[I] ou [A] relativement minime. Ceci permet d'ajuster très finement l'activité enzymatique en fonction de variations très faibles des conditions environnementales, survenant généralement dans une gamme de concentrations critique pour l'organisme en question.



FIN DU RAPPEL

Envisageons à présent quelques exemples écologiquement importants de modifications des cinétiques de dégradation en rapport avec la présence de composés "parasites" dans le milieu réactif :

- ♦ Impact de la présence de composés phénoliques sur l'activité des enzymes hydrolytiques (inhibition non-compétitive)
- ♦ Inhibition compétitive de la β -glucosidase par divers composés organiques
- ♦ Activation/inhibition de la chitinase par les ions métalliques

□ Les **polyphénols** sont un élément essentiel des acides organiques de la MOD (jusqu'à 80 % de la matière dissoute, soit jusqu'à 4 à 8 mg de polyphénols par litre). Ils sont essentiellement d'origine végétale. Leur faible taux de biodégradation (voir chap.4, au mieux 0.5 à 1 % par jour) les fait persister très longtemps dans la MOD dont ils constituent un des éléments les plus réfractaires. Ils contribuent à modifier la conformation des protéines (jusqu'à l'inactivation par précipitation) en se fixant par liaison hydrogène avec différents radicaux à leur surface.

Si la teneur en protéines dans le milieu est basse (ce qui est le cas général du milieu marin), les polyphénols constituent une monocouche de surface (Fig. 2.22.A) plus hydrophobe que la protéine elle-même, pouvant résulter, dans les cas extrêmes, en la précipitation des enzymes. De toute façon, la réactivité de la protéine est réduite et donc, fatalement, ses activités enzymatiques. A plus haute concentration en protéines (par exemple en estuaire), des ponts peuvent se créer entre les protéines par l'intermédiaire des polyphénols (phénomène similaire au tannage quinonique des scléroprotéines animales, fig. 2.22.B). Moins de polyphénols seront donc nécessaires pour arriver à précipiter de tels macroagrégats protéiques, d'où une "efficacité" accrue en cas de forte teneur du milieu en enzymes. Les composés polyphénoliques les plus condensés et les plus aromatiques (**acides humiques**) sont plus "rigides" et donc peuvent déformer plus aisément et plus fortement les molécules protéiques que les composés plus simples, comme les **acides fulviques** par exemple.

L'efficacité des polyphénols provient de la multiplicité de leurs ligands (voir cours "Cycles biogéochimiques" en 2LZ), donc des possibilités d'établissement de liaisons hydrogènes par les groupes quinoniques ou aryles cycliques disposés en périphérie de la molécule. Les composés phénoliques mono- ou polyhydroxylés sont les plus efficaces. Les acides humiques et fulviques ont ainsi la capacité de former des complexes stables avec un grand nombre de protéines naturelles de par leur taille moléculaire et leur structure. L'inhibition est de type non-compétitif (Fig. 2.23) : inhibiteur et substrat se fixent simultanément sur l'enzyme. Les **enzymes protéolytiques** et les phosphatases sont particulièrement affectés par ce type d'inhibition en milieu marin.

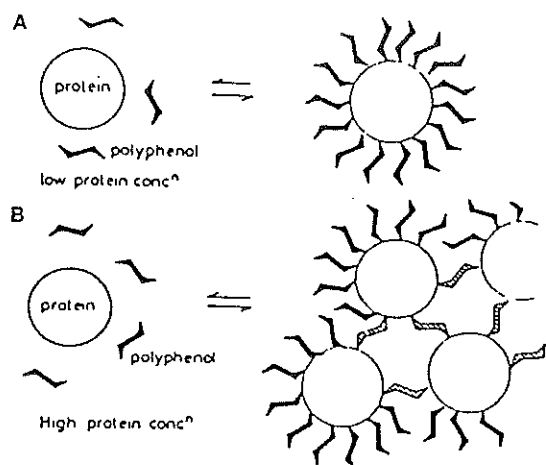


Fig. 2.22 Formation de complexes entre les protéines et les polyphénols
[d'après Haslam, 1988]

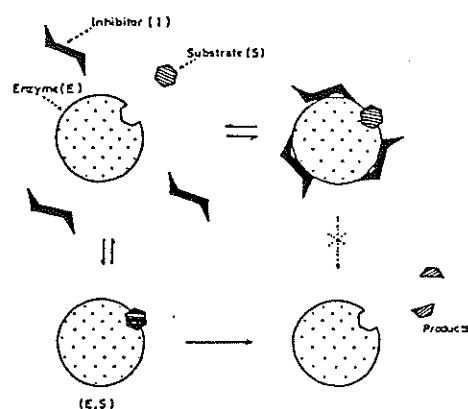


Fig. 2.23 Inhibition enzymatique par les polyphénols
[d'après Haslam & Lilley, 1988]

Cette inhibition est *réversible* selon deux voies : d'une part on peut constater une *photolyse des complexes* par les rayons UV (phénomène peu important) et, d'autre part, par *biodégradation des polyphénols* suite à d'autres réactions enzymatiques (v.chap. 4). L'interaction avec d'autres systèmes de dégradation rend ce problème extrêmement complexe. La réactivité de divers groupes polyphénolique sera très variable : l'efficacité inhibitrice des composés tels les acides phénoliques (acide p-hydroxybenzoïque) est moins importante que celle des phénylpropanoïdes (acides hydroxycinnamique, p-coumarique, caféïque ou férulique). L'*origine* et l'*âge* des dérivés polyphénoliques seront donc d'une extrême importance pour la détermination de l'activité inhibitrice du milieu. Enfin la présence de certains ions inorganiques (Ca^{++} , par exemples) va réduire la formation des complexes protéine-polyphénols, et donc l'inhibition enzymatique, par réaction de ces ions avec les acides organiques ($-\text{COO}^-$).

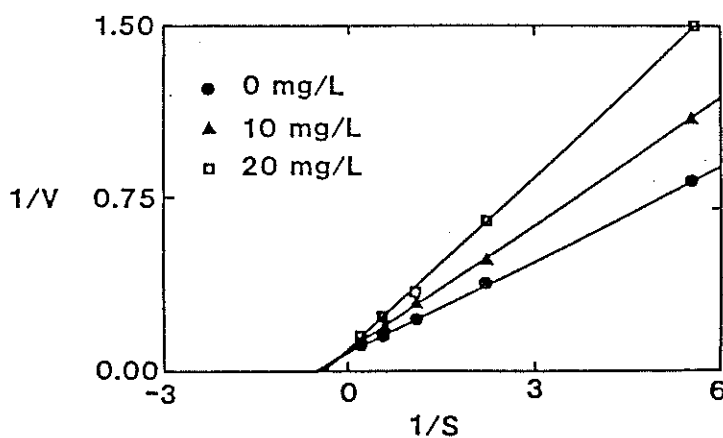


Fig. 2.24 Inhibition de la phosphatase alcaline en milieu tamponné par des mélanges naturels d'acides humiques à diverses concentrations. [d'après Wetzel, 1991]
Représentation selon Lineweaver & Burke.

D'un point de vue expérimental, ces phénomènes ont pu être visualisés dans le cas de la phosphatase alcaline (travaux de Wetzel, 1991). La figure 2.24 illustre le phénomène d'inhibition de la PhAlc par un ensemble de phénylpropanoïdes naturels. La représentation selon Lineawaver & Burke montre clairement l'effet de l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur (de 0 à 20 mg/l, valeur très élevée par rapport aux conditions couramment rencontrées) sur la vitesse initiale ($1/v$ porté en ordonnée) alors que le K_m reste non affecté (les trois droites coupent l'axe des abscisses au même point). L'inhibition est de type non-compétitif.

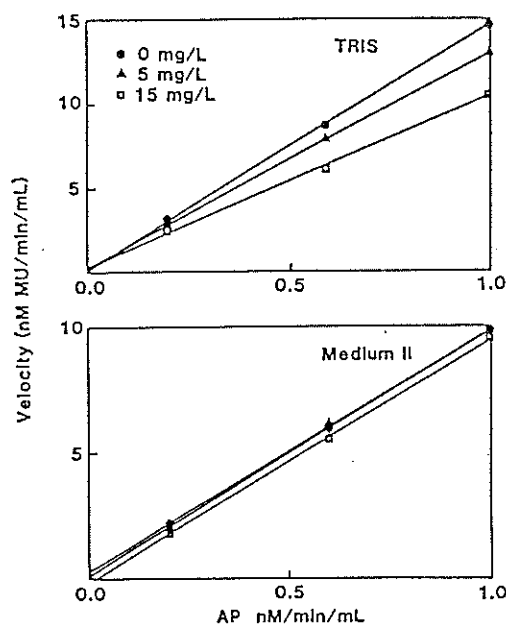


Fig. 2.25 Effet de l'augmentation de la teneur en acide humique (pyrogallol) sur les caractéristiques cinétiques de la PhAlc, en milieu tamponné au Tris (en haut) ou par un tampon minéral (Wetzel Médium II, en bas). (Vitesses initiales en fonction de la teneur en enzyme)

En modifiant les caractéristiques du milieu d'incubation, il est possible de modifier l'impact des acides humiques, toutes autres choses étant égales (pH, température, composition des acides humiques utilisés, ...). La figure 2.25 illustre ce phénomène dans le cas de l'inhibition de la PhAlc par le pyrogallol (acide phénolique polyhydroxylé). En haut, on observe l'inhibition non-compétitive de l'enzyme pour des valeurs croissantes de la teneur du milieu réactif en pyrogallol. Dans ce cas, le milieu réactionnel est tamponné au Tris pH 8.0 (tampon organique). En bas, le graphique illustre ce même phénomène, toutes autres choses étant égales, dans le cas d'un milieu tamponné par des sels minéraux (tampon Wetzel II, pH 8.0). On remarque que l'inhibition n'est plus proportionnelle à la teneur en pyrogallol, celui-ci ayant en grande partie complexé les ions divalents du milieu. D'autres expériences où l'on a fait varier les teneurs en cations divalents ont montré une réduction de l'inhibition proportionnelle à la teneur en ions. ceux-ci peuvent déplacer l'enzyme du complexe en se fixant sur le radical carboxyle des acides humiques, où s'effectue la liaison avec les protéines (souvent via les radicaux $-NH_2$).

□ Il est bien connu que la synthèse et l'activité spécifique de nombreux ectoenzymes sécrétés par les microorganismes aquatiques sont inhibées par le produit final de la (chaîne de) réaction(s) s'accumulant dans le milieu. La répression de la synthèse et l'inhibition compétitive des phosphatases par l'ion PO_4^{3-} dans le cas des bactéries et des micro flagellés en est un exemple bien démontré. Dans le cas de la β -glucosidase, Chrost a montré l'impact de divers composants organiques, naturellement issus de la dégradation du phytoplancton (Fig.2.26).

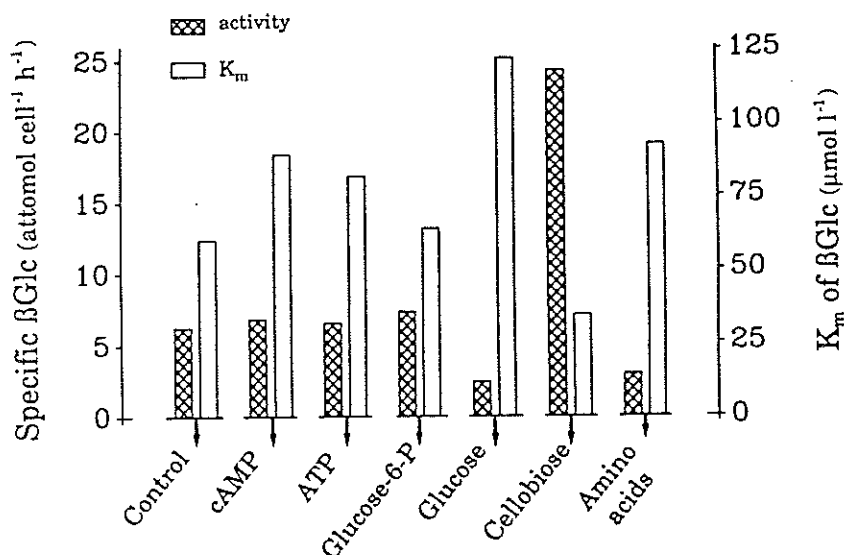


Fig. 2.26 Activités spécifiques et K_m de la β -glucosidase bactérienne. Incubations de 24 h en conditions naturelles à 15°C (milieu filtré sur 1.5 μ m supplémenté de 100 μ mol de différents substrats organiques). [D'après Chrost, 1991].

Dépendant du composé ajouté au milieu réactionnel (naturel), on constate une stimulation ou une inhibition de la synthèse (et donc de l'activité spécifique) de la β -glucosidase de populations microbiennes naturelles (mer Baltique) et des modifications de l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

Les *esters phosphorylés* (AMP, ATP, glucose-6-phosphate) ne modifient pas significativement l'activité spécifique de l'enzyme par rapport aux témoins. Par contre, ils diminuent l'affinité de l'enzyme pour son substrat (augmentation des valeurs du K_m). Il s'agit donc d'une inhibition compétitive.

La réduction la plus importante de l'activité spécifique de l'enzyme (répression de la synthèse) ainsi que l'augmentation du K_m est donnée par l'ajout de *glucose* ou d'*acides aminés*. Il est vraisemblable que la présence de "substrats directs" inhibe la synthèse des enzymes hydrolytiques, ces substrats agissant comme répresseurs cataboliques (v.fig. 2.12, p.20). De plus, en parallèle avec cette répression de la synthèse, le glucose réduit la vitesse initiale de la réaction (mais non la V_{max}) et double la valeur du K_m (forte réduction de l'affinité enzyme-substrat). L'inhibition compétitive est ici très intense.

A l'inverse, l'ajout, au milieu réactionnel, de 100 μ mol de *cellobiose* (dimère de glucose, substrat idéal de la β -glucosidase) induit fortement la synthèse de l'enzyme (haute activité spécifique), dont les caractéristiques cinétiques se distinguent par une forte activité et une très haute affinité pour le substrat (K_m bas).

Des observations similaires ont été faites pour d'autres activités hydrolytiques, par exemple des protéases (Leu-aminopeptidase, ...).

□ Les ions métalliques, et particulièrement les métaux lourds, ont souvent une activité inhibitrice, rarement activatrice, sur nombre de réactions hydrolytiques. Ces paramètres sont particulièrement importants à prendre en compte lorsqu'on étudie les processus de dégradation en milieu pollué (boues des stations d'épuration, effluents industriels, ...) afin de tenir compte de cet effet sur les prévisions d'efficacité des systèmes épurateurs.

Un exemple des interactions entre métaux et activités hydrolytiques peut être trouvé dans le cas des chitinases. La chitine, haut polymère linéaire de N-acétyl-D-glucosamine, possède de bonnes propriétés de chélation vis-à-vis d'un grand nombre d'ions, essentiellement les métaux de transition. En milieu marin, la chitine détritique est saturée d'éléments métalliques. Or, on peut mettre en évidence que ces métaux chélatés interagissent dans un sens ou un autre, avec les activités chitinolytiques (fig. 2.27).

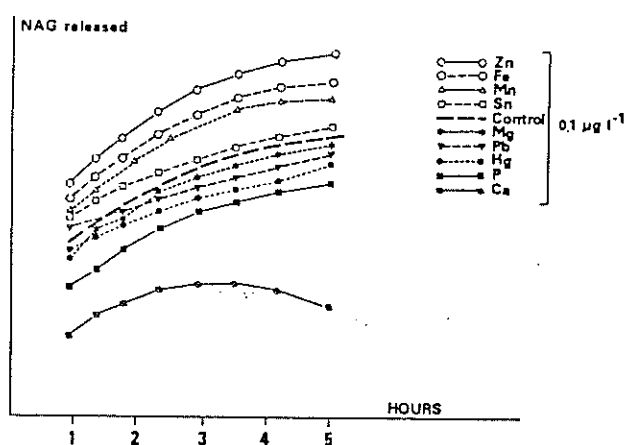


Fig. 2.27 Cinétiques de libération de NAG à partir de chitine colloïdale en présence de différents éléments (0.1 µg/l)
[D'après Kimura in Poulicek, 1985]

Certains éléments ont une activité activatrice (Zn, Fe, Mn et Sn) tandis que d'autres sont inhibiteurs (Mg, Pb, Hg, Cd, P et Ca). Cette activation de l'hydrolyse de la chitine par les métaux chélatés par le polymère s'effectue dans une gamme limitée de concentrations (Fig. 2.28).

Suite à cette hydrolyse, les métaux chélatés par la chitine sont libérés dans le milieu ambiant, d'où l'importance de ces processus dans l'étude de la contamination du milieu marin par les métaux lourds (Fig. 2.29).

De nombreux polymères sont capables de fixer les métaux à l'état ionique, de manière réversible ou non. L'interaction entre ces polymères et les coefficients de partition ionique des métaux conditionneront les caractéristiques de biodégradation de ces molécules. Dans cet ordre d'idée, les acides humiques ont de fortes capacités chélatrices vis-à-vis d'un grand nombre d'éléments divalents (Fig. 2.30). De même, ces acides humiques auront tendance à former des complexes stables avec certains minéraux argileux (pour former les "complexes argilohumiques") et avec les protéines (v. p. 28-30). D'une part, la formation des complexes argilohumiques aura des répercussions sur les capacités chélatrices vis-à-vis des métaux et sur l'adsorption des polyphénols sur les protéines (donc sur l'activité et l'affinité des enzymes). D'autre part, la fixation des métaux sur les polymères substrats modulera certaines activités enzymatiques dans un sens ou un autre, dépendant du coefficient de partition avec les acides humiques, de la composition et de la teneur en ions. On voit donc que tous ces phénomènes de contrôle sont complètement intriqués les uns dans les autres, rendant la compréhension de ces

processus, et encore plus la modélisation ou les essais de simulation extrêmement complexes.

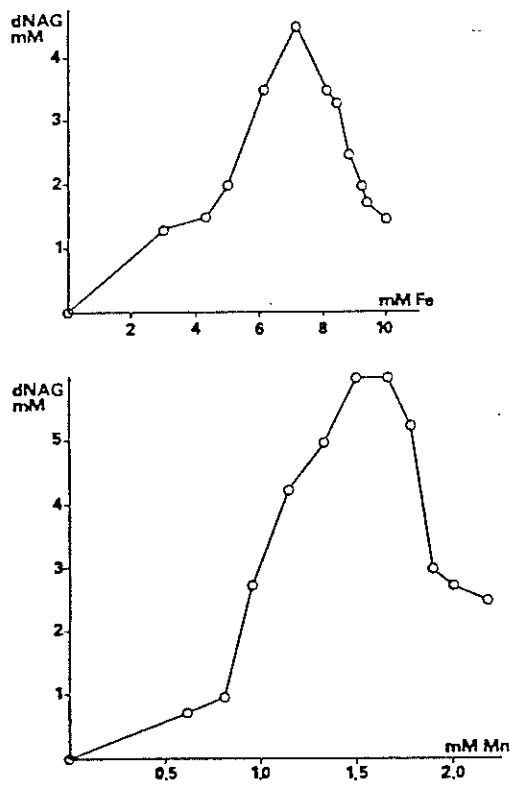


Fig. 2.28 Taux d'activation des activités chitinolytiques en fonction de la teneur du polymère en métaux

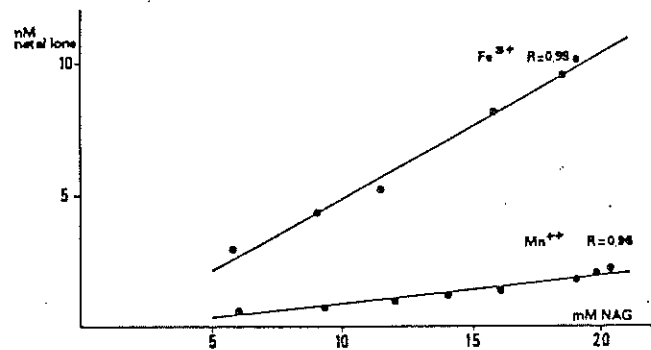


Fig.2.29 Libération d'ions métalliques à partir de chitine saturée de Fe³⁺ et Mn²⁺

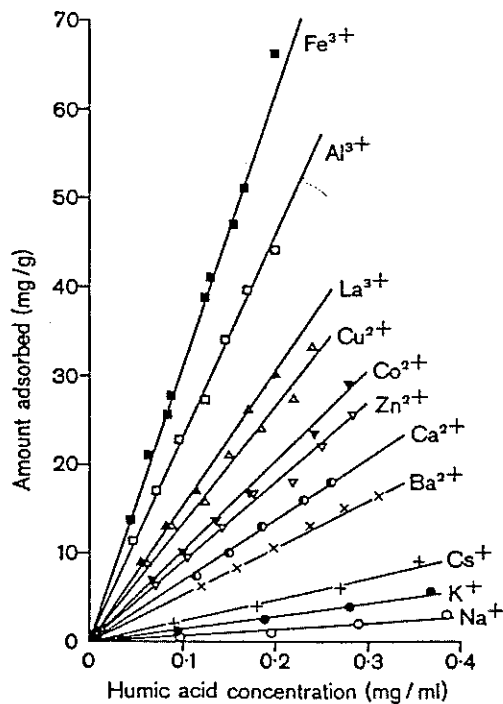


Fig. 2.30 Isothermes de fixation de différents éléments à l'état ionique sur des complexes argilohumiques naturels.

2.7 Modalités de la biodégradation des molécules organiques naturelles

L'ensemble des concepts exposés ci avant permet de proposer un modèle conceptuel simple de la dégradation de la matière organique en milieu marin. *Ce modèle s'applique essentiellement aux modalités de la dégradation de la MOP et de la MOD en pleine eau, et ne concerne que les molécules "naturelles" dans une gamme de concentrations "normales"*.

Les **bactéries associées aux particules** (bactéries "liées" , attached bacteria) sont relativement peu abondantes. Elles sécrètent préférentiellement des **endohydrolases solubles**, diffusibles, adaptées à la composition des polymères des particules, au sein de la MOP auxquelles elles adhèrent. Cette activité tend à solubiliser les agrégats en polymères de faible poids moléculaire et en oligomères solubles dont une grande partie diffuse vers l'eau libre suite au **mauvais couplage entre hydrolyse et absorption** dans le cas des enzymes diffusibles et aux problèmes de diffusion de surface au niveau des membranes bactériennes.

La MOD ainsi produite devient accessible aux **bactéries "libres"** plus abondantes. Ces dernières hydrolysent ces oligomères grâce à l'activité d'**exohydrolases** fermement attachées à la paroi (ectoenzymes). L'**excellent couplage entre hydrolyse et uptake** rend cette phase extrêmement "efficace".

Dans les sédiments, les données relatives à la biodégradation des composés organiques particuliers sont moins précises et ne permettent pas de proposer, à coup sûr, un modèle fiable à l'heure actuelle. Les problèmes de diffusion dans un milieu poreux (eau interstitielle), l'hétérogénéité des conditions de l'environnement (microdistribution sur les grains sédimentaires, interfaces, discontinuité redox, variations de $[O_2]$, rH, ...) et l'adsorption des enzymes, substrats et nutriments à la surface des complexes argilo-humiques rendent le processus nettement plus complexe qu'en eau libre. Toutefois, dans une première approche, les concepts relatifs au modèle de pleine eau (Modèle de Hoppe, Overbeck, Azam et coll.) pourront être étendus au milieu sédimentaire. Une différence essentielle réside toutefois dans la distribution des bactéries et des hydrolases dans les deux pools "eau interstitielle" et "particules". Tant les enzymes que les bactéries sont dans une très large mesure inféodés aux grains sédimentaires (notamment par fixation à l'aide du glycocalyx), les enzymes et bactéries "libres" sont très peu abondants. Les connaissances quant aux processus de régulation des phénomènes de biodégradation sont également, pour le moins, succinctes. L'existence de telles régulations n'est pas douteuse, et on peut observer des phases d'activité hydrolytiques corrélées à la composition et aux biomasses de matériel à dégrader, mais ceci n'a jamais fait l'objet de travaux détaillés.

En eau libre (et, avec les réserves proposées plus haut, dans les sédiments), on peut schématiser le processus comme sur la Fig. 2.31 .

L'ensemble de ce processus est finement modulé par un nombre important de facteurs internes ou externes :

- caractère cyclique de l'activité bactérienne

- phénomènes d'induction et de répression au niveau des sites de synthèse des hydrolases

- phénomènes d'activation/inhibition par des produits de la réaction ou des médiateurs chimiques externes (métaux lourds, acides humiques, ...)

- ...

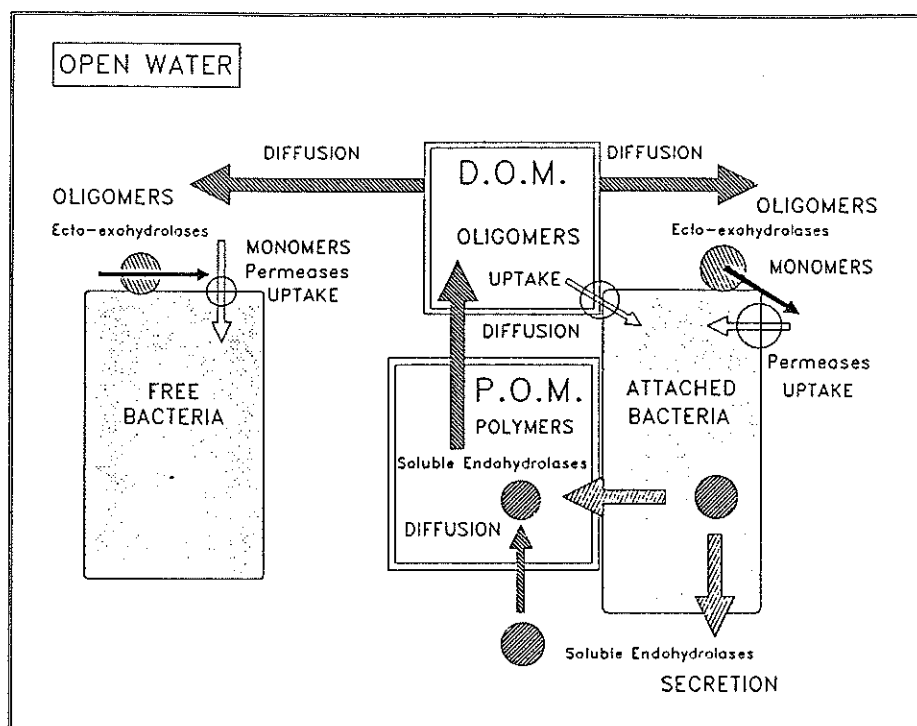


Fig. 2.31 Schéma fonctionnel de la dégradation bactérienne de la matière organique en pleine eau

Ce modèle, complété par Munster permet ainsi de resituer ces phénomènes de biodégradation dans le contexte général de l'écologie de la pleine eau (Fig. 2.32).

Il apparaît de plus en plus évident que, en milieu marin, l'essentiel des flux de nutriments et d'énergie s'effectue via les chaînes trophiques de détritivores. Ainsi, l'utilisation et la transformation de la matière détritique joue un rôle clé dans la compréhension du fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Dans le modèle de MUNSTER, on reconnaît les principaux éléments représentés à la figure 2.31 avec, en plus, le couplage de ces processus de biodégradation par les microorganismes avec les autres chaînes trophiques, via les suspensivores et la "microbial loop".

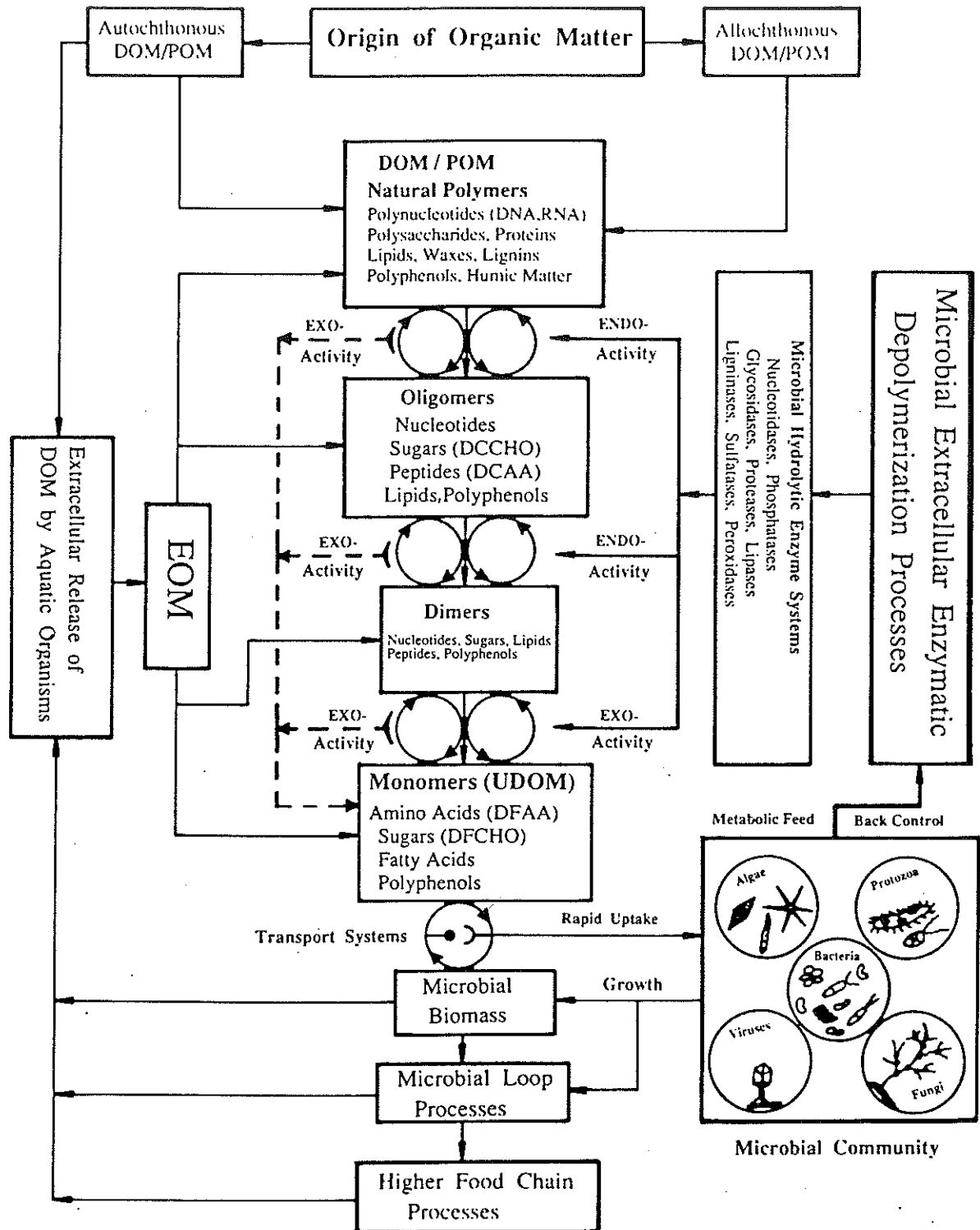


Fig. 2.32 Essai d'intégration du modèle de dégradation des molécules organiques en pleine eau dans le contexte des cycles écologiques de l'eau libre.

3.- LES MODELES MATHEMATIQUES DE BIODEGRADATION

Si la description quantitative des flux de matière est le point de départ de toute étude écologique d'écosystème, elle est loin d'en constituer l'aboutissement. Trop d'études se contentent de décrire des flux de manière toujours plus détaillée, mais sans tenter d'en percevoir à jour les mécanismes ou de mettre en évidence les signaux de contrôle. Cette étude des échanges d'information est cependant nécessaire pour comprendre pleinement le fonctionnement des écosystèmes. Le but de ce présent chapitre est de proposer, d'abord, une analyse minutieuse des processus de base de la dégradation bactérienne de la matière organique et d'en établir un modèle détaillé (modèle de Billen et Servais). Par la suite, nous envisagerons d'autres modèles dont le but n'est pas de décrire le fonctionnement du système mais plutôt de prédire la distribution des composés organiques dans un sédiment et d'évaluer les taux de recyclage (modèles géochimiques).

3.1 Modèle de Billen et Servais

Une étude précise du processus de dégradation bactérienne nécessite une analyse minutieuse des interactions entre la matière organique et les microorganismes qui la dégradent.

La figure 3.1 présente schématiquement ces interactions.

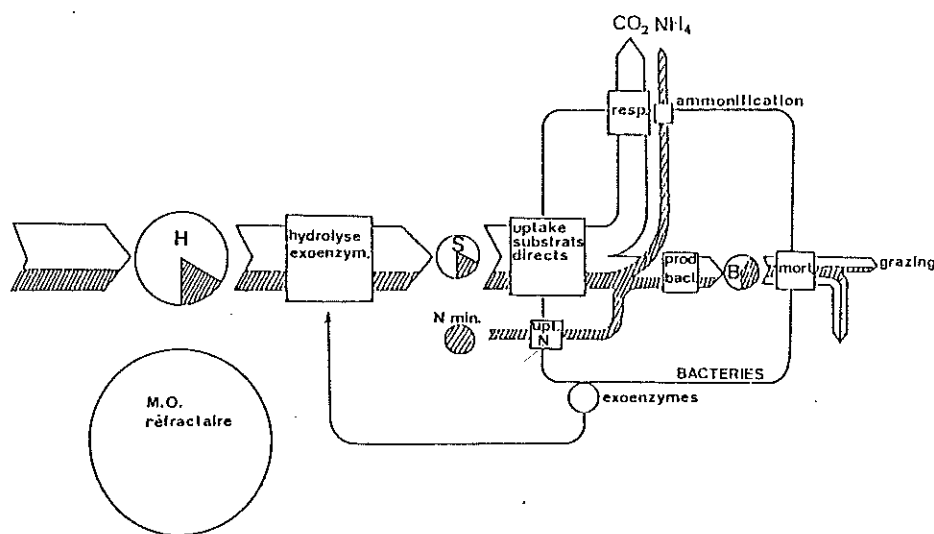


Fig. 3.1 Représentation schématique des étapes élémentaires de l'utilisation bactérienne de la matière organique en milieu aquatique (en blanc, les flux de C, en hachuré, les flux de N) [d'après Billen & Fontigny, 1987]

Seules peuvent être utilisées *directement* pour la croissance bactérienne, un certain nombre de petites molécules organiques (AA libres, mono- et oligosaccharides, ...) reconnues par les perméases et, ainsi, sont susceptibles de pénétrer les cellules. Ces petites molécules seront appelées *substrats directs* (S). Elles forment le stock de matière organique (MO) directement utilisable qui contrôle effectivement la croissance bactérienne. Les substrats directs (S) sont produits par hydrolyse enzymatique des *composés polymériques* (H). Ils sont en partie catabolisés, en partie anabolisés. Dans le

premier cas ils sont généralement oxydés en CO_2 ; dans le second cas, ils serviront à la **production de biomasse bactérienne (B)**. La part de la production de biomasse bactérienne dans l'utilisation totale de matière organique est définie comme le **rendement de croissance (Y)** des bactéries. La biomasse bactérienne produite est soumise à un processus de mortalité (par lyse des cellules ou par broutage). Une partie de cette biomasse est donc recyclée vers le pool de matière organique, et une autre, entraînée via le microzooplancton vers les niveaux trophiques supérieurs.

Nous détaillerons successivement chacun de ces points (cinétique d'hydrolyse, uptake de substrats directs, croissance et mortalité bactérienne) à l'issue de quoi une formalisation mathématique de l'ensemble de ces processus sera établie.

□ Hydrolyse enzymatique des composés polymériques

Des méthodes ont été mises au point pour mesurer sur des temps courts (de l'ordre de quelques minutes) l'activité des enzymes hydrolytiques (protéases, osidases, ...) avec grande précision et une excellente sensibilité. Ces méthodes, adaptées de procédures en usage en biologie clinique, sont basées sur l'utilisation de substrats artificiels non fluorescents mais donnant lieu à la libération d'un chromophore fluorescent lors de leur hydrolyse (L-leucyl- β -naphtylamide et L-leucyl-4-méthyl-7-coumarinylamide pour les aminopeptidases, dansylglycyl-L-tryptophane pour les carboxypeptidases, 4-méthylumbelliferyl- β -D-glucuronide pour la β -glucuronidase, 4-méthylumbelliferyl- β -D-galactoside pour la β -galactosidase, ...). La mesure à concentration saturante du substrat artificiel fournit un **taux potentiel d'hydrolyse** (directement proportionnel à la concentration de l'enzyme). D'autre part, en utilisant différentes concentrations de substrat (non saturantes), on peut aborder le problème de la **spécificité** et de la **cinétique des hydrolases** étudiées (V_{\max} et K_m).

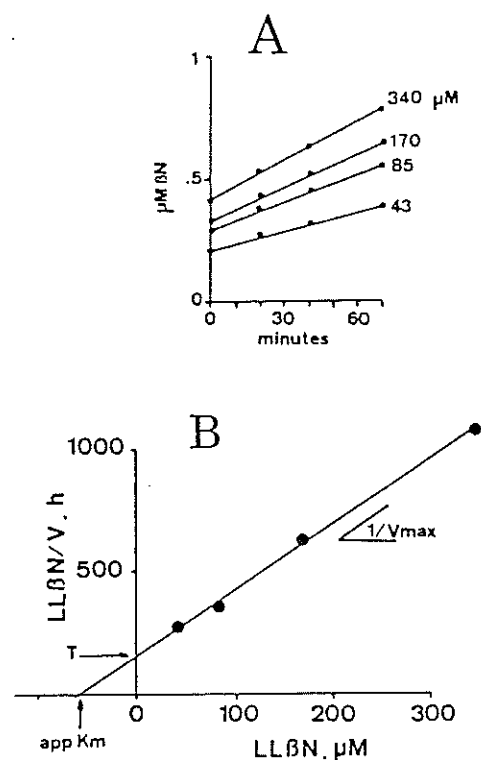


Fig. 3.2 Détermination des paramètres cinétique de la Leu-arylamidase d'un échantillon prélevé en mer du Nord.

A.- augmentation de la fluorescence au cours du temps pour diverses concentrations de LL β N.

B.- Formalisme de Lineweaver & Burke permettant la détermination de V_m , K_m et T

Des auteurs ont aussi utilisé des protéines marquées à l' ^{125}I et au ^{14}C et mesuré la radioactivité apparaissant soit dans la fraction $< 0.22 \mu\text{m}$ insoluble dans le TCA (protéines solubles) ou dans le CO_2 émis. Cette méthode, récemment critiquée, a cependant permis de vérifier les résultats acquis par ailleurs. La Fig. 3.3 illustre la variation au cours du temps de la teneur en protéines solubles (précipitées par le TCA). En (A), on a représenté les résultats du *calcul* dans le cas d'une activité exoprotéolytique (à gauche) et endoprotéolytique (à droite). Les calculs ont été effectués pour plusieurs valeurs de V_{max} (mesurées in situ à l'aide des substrats fluorogéniques) et sur des mélanges de protéines marquées au $^{14}\text{CH}_3$ (mélanges L et H). En (B), on donne un exemple d'une *mesure expérimentale* de la dégradation des mêmes mélanges de protéines marquées, dans deux sites de la mer du Nord.

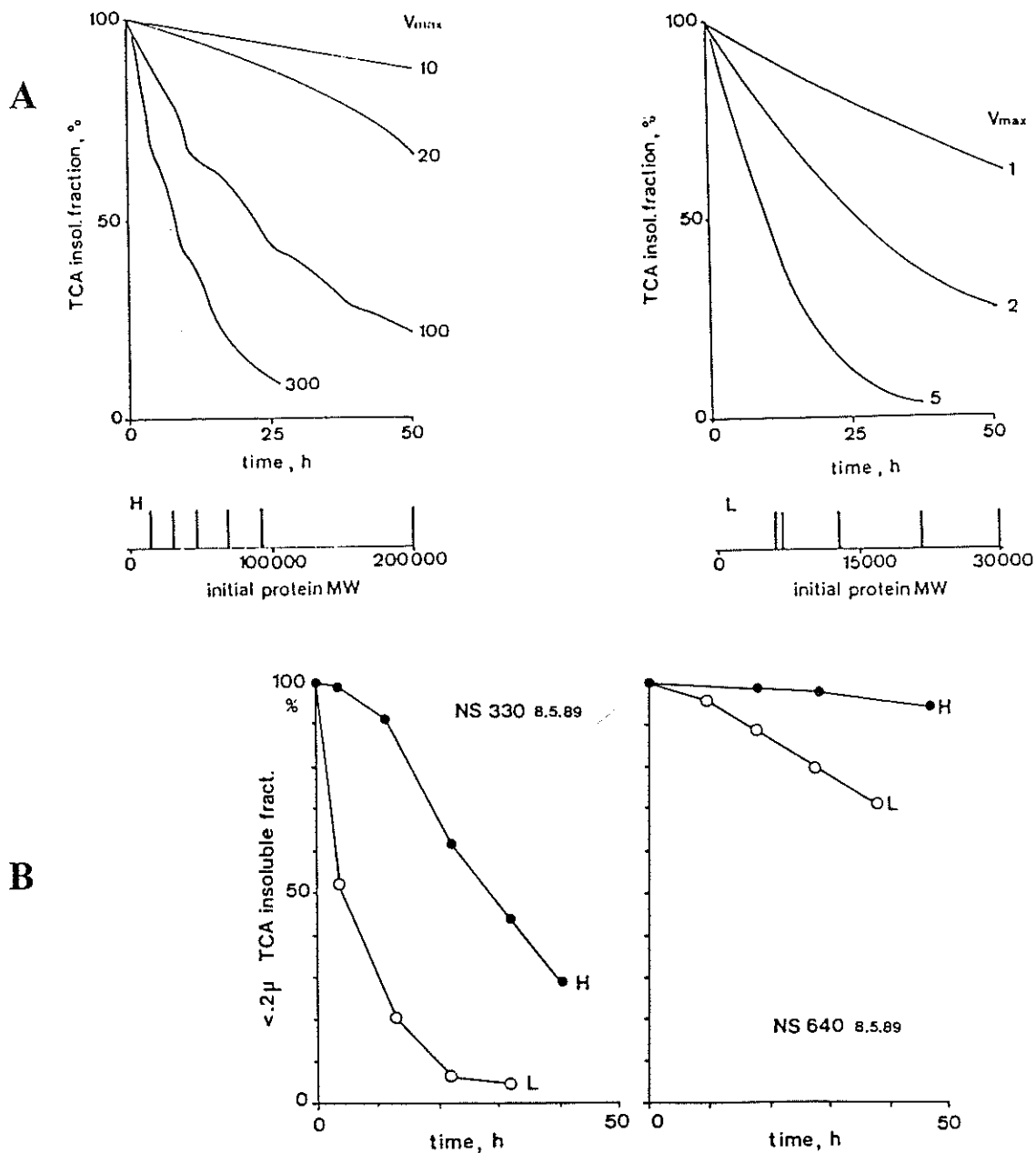


Fig. 3.3 : Calcul des cinétiques de dégradation des protéines en milieu marin (voir texte)
(A) comparé aux mesures expérimentales in-situ

L'interprétation des cinétiques de dégradation des protéines est complexe parce qu'elle dépend fortement de la masse moléculaire des protéines. Deux modèles ont été élaborés, l'un concernant l'activité exoprotéolytique pure, l'autre, l'activité endoprotéolytique. Le K_m utilisé correspond à celui qui a été déterminé expérimentalement en mer du Nord à l'aide de substrats fluorogéniques. Les résultats des prédictions du modèle sont très différents dans l'un et l'autre cas. De manière générale, en milieu marin, la **meilleure corrélation** des valeurs calculées et mesurées expérimentalement est observée pour une simulation concernant les **exoprotéases**.

Pour déterminer le K_m des protéases vis à vis des assemblages naturels de protéines solubles dans le milieu, la technique des substrats fluorogéniques a encore été utilisée. En effet, les protéines et peptides du milieu agissent comme des inhibiteurs compétitifs de LL β N. Ainsi, elles ne modifient pas la V_{max} mais augmentent le K_m de LL β N suivant la relation :

$$K_m \text{ app} = K_m (1 + I/K_i) \quad (\text{v.p.24-25})$$

avec $K_m \text{ app}$, le K_m de LL β N mesuré dans ces conditions, K_m la valeur théorique (sans inhibiteur), I la teneur en protéines du milieu et K_i , la **constante d'inhibition, qui est aussi le K_m des protéines inhibitrices**, valeur recherchée. La fig. 3.4 illustre cette approche dans le cas de la mer du Nord.

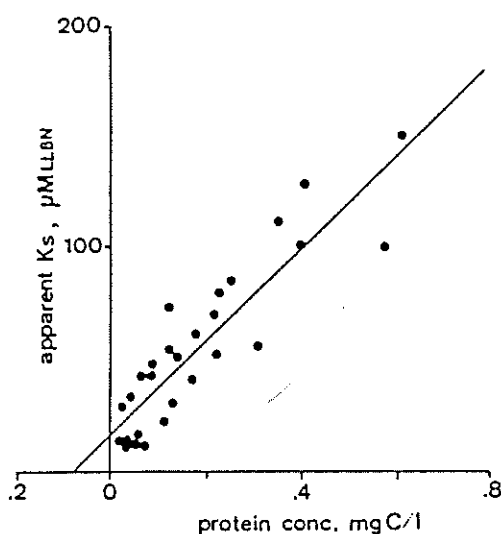


Fig. 3.4 Détermination expérimentale du K_m d'un assemblage de protéines naturelles dans l'eau de la mer du Nord vis à vis des aminopeptidases. [D'après Fontigny, 1987]

La V_{max} , en conditions optimales peut être considérée comme un bon indicateur de la **concentration en enzymes**. Cette valeur, corrélée à la biomasse microbienne présente (mesurée par l'intermédiaire de marqueurs biochimiques, ADN, ATP, peptidoglycane,... ou par détermination directe, comptages en épifluorescence) fournit toujours d'excellentes corrélations (Fig. 3.5, voir aussi Fig.2.11). Ceci peut-être interprété comme le fait que les processus de régulation de la synthèse des exoprotéases ne sont pas très significatifs en conditions naturelles (milieu marin où l'apport en protéines est continu) et peuvent être négligés dans une optique de modélisation. On considérera dès lors que la

capacité exoprotéolytique (EPA) peut être considérée comme une propriété constitutive de la biomasse bactérienne

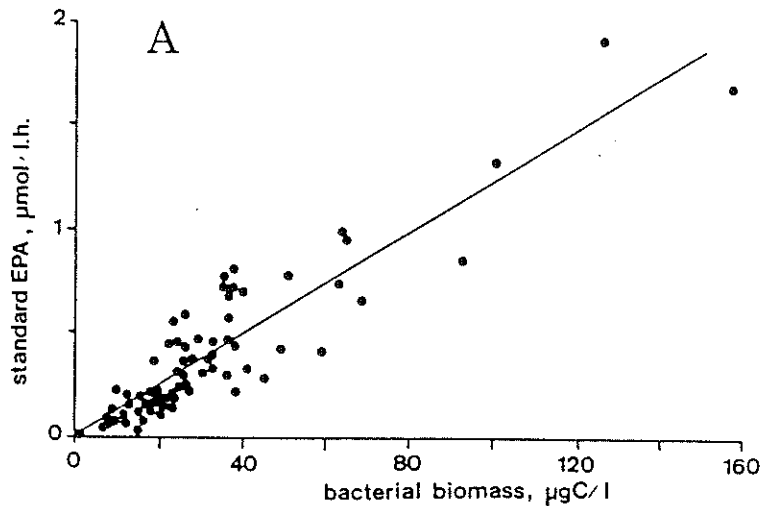


Fig. 3.5 : Relation entre l'activité protéolytique standardisée (EPA, 20°C, V_{max} d'hydrolyse de LLβN) et la biomasse bactérienne (calculée à partir des biovolumes et de comptages en épifluorescence) dans le cas des régions côtières de la mer du Nord

Régression : $EPA(\mu\text{mol l}^{-1} \text{ h}^{-1}) = 12 * \text{biomasse}(\mu\text{gC l}^{-1}) + 12$ ($r=0.90$, $n=73$)
[D'après Billen, 1991]

Dans ces conditions, on peut proposer une relation michaélienne des vitesses d'hydrolyse des protéines en conditions naturelles (également applicable à d'autres composés que les protéines)

$$V_{\text{hydr}} = \frac{e_{\text{max}} H}{H + K_H} * B$$

avec e_{max} , la vitesse maximale par bactérie d'hydrolyse du substrat,
 K_H , la constante de demi-saturation de l'enzyme pour son substrat
 H , la concentration en substrat
 B , la biomasse bactérienne.

□ Prélèvement de substrats directs

Il est possible de mesurer l'utilisation des substrats directs par marquage isotopique des stocks de substrats directs et mesure de l'incorporation de la radioactivité dans la fraction particulaire (>0.22 μm) et de sa respiration en CO₂.

Malgré l'hétérogénéité des communautés microbiennes des eaux naturelles, il a été reconnu depuis longtemps que la vitesse d'utilisation d'un substrat direct par les communautés naturelles de microorganismes peut être considérée comme obéissant à une simple cinétique michaélienne. Les rares cas où cette relation ne peut être utilisée concernent des milieux extrêmement oligotrophes (eaux abyssales et hadales, milieux de pleine eau des gyres océaniques, ...) où la diversité des souches est considérable. Dans les autres cas, soit une souche domine les autres dans l'utilisation du substrat, soit toutes les souches ont des K_s très semblables. On a donc :

$$V_{\text{uptake}} = \frac{V_{\text{max}} S}{S + K_s} * B$$

avec S , concentration du substrat considéré,
 V_{max} , vitesse maximale de l'utilisation du substrat par unité de biomasse bactérienne
 K_s , constante de demi-saturation de l'uptake de ce substrat
 B , biomasse bactérienne

Un grand nombre de valeurs de K_s de communautés microbiennes naturelles ont été rapportées pour différents substrats directs. Elles varient dans les fourchettes suivantes :

- acides aminés	0.03 - 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$
- glucose	0.02 - 2 $\mu\text{mol l}^{-1}$
- glycollate	0.60 - 3 $\mu\text{mol l}^{-1}$
- acétate	0.10 - 5 $\mu\text{mol l}^{-1}$

Les valeurs les plus élevées sont généralement mesurées dans les milieux les plus eutrophes. Ce résultat peut être interprété comme le reflet d'une compétition entre microorganismes pour le substrat : plus la disponibilité diminue, plus la pression sélective est forte pour développer des systèmes de perméases à grande affinité pour le substrat.

□ Rendement de croissance

La croissance des populations microbiennes a fait l'objet de travaux très nombreux dont la relation sortirait du cadre de ce cours. Plusieurs modèles existent, plus ou moins complexes, en relation avec les conditions du milieu. Quant à la mesure de la production bactérienne, vu que toute division cellulaire s'accompagne de la production d'une nouvelle molécule d'ADN, la mesure de la vitesse de synthèse de cet ADN bactérien est, conceptuellement, une mesure très élégante, précise et fiable, pour estimer cette vitesse de production. Dans ce cadre, Fuhrman et Azam ont proposé une méthode, maintenant devenue classique, d'évaluation de cette production par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN bactérien (seuls les procaryotes possèdent les voies métaboliques permettant son incorporation directe dans le matériel génétique [salvage pathway]). La production cellulaire est convertie en biomasse en tenant compte de la

taille moyenne des bactéries (mesurée en épifluorescence) et d'un facteur de conversion volume/biomasse (généralement évalué à $1.2 \cdot 10^{-7} \mu\text{gC } \mu\text{m}^{-3}$).

Le **rendement de croissance** (Y) est le rapport entre la biomasse bactérienne produite et l'utilisation de matière organique. La comparaison des mesures de production bactérienne et des mesures d'utilisation totale de substrats directs permet d'estimer globalement le rendement de croissance. Les données de la figure 3.6 montrent qu'en mer, Y est généralement compris entre 0.1 et 0.3. Des mesures en rivière (grande richesse en nutriments), montrent un Y de 0.3. Il se pourrait que les valeurs plus basses observées en mer résultent d'une certaine limitation par l'azote de la production bactérienne.

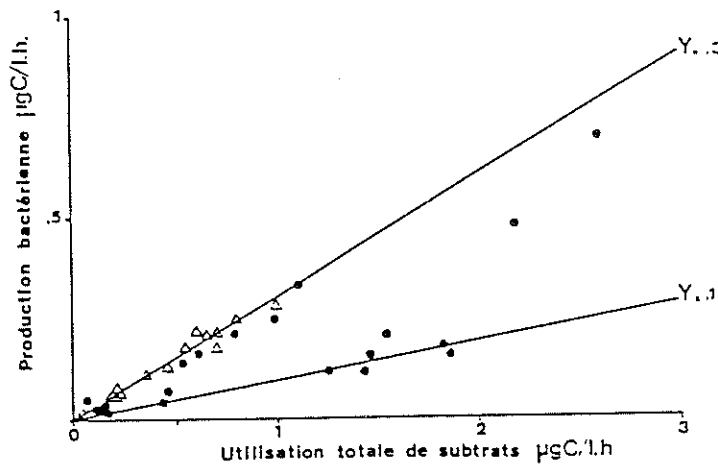


Fig. 3.6 Relation observée entre la production bactérienne et l'utilisation totale de substrats directs. Les droites représentent les relations attendues pour des rendements de croissance respectivement de 0.3 et de 0.1

● Mer du Nord (printemps 1984 à 1986)

▽ rivières

□ Mortalité bactérienne

Billen et coll. ont mis au point une mesure de la "mortalité" bactérienne basée, comme la mesure de la croissance, sur le marquage de l'ADN bactérien par la thymidine tritiée. La méthode consiste à suivre la disparition du marqueur dans l'ADN après élimination de la thymidine marquée du milieu extérieur. Comme l'ADN, à l'exception des processus de réparation, négligeables à notre échelle, ne subit aucun processus de turnover interne, cette disparition doit être attribuée à la destruction des cellules qui le contenaient et à l'hydrolyse de leur matériel génétique (Fig. 3.7)

Une augmentation très nette avec la température a été mise en évidence. Par contre, l'addition de substrats de croissance, en début ou en cours d'expérience, ne modifie en rien la constante de mortalité, suggérant que la mortalité, en milieu naturel, n'est pas liée à la starvation des bactéries.

La mortalité bactérienne obéit donc à une loi de premier ordre :

$$B = B_0 e^{-kdt}$$

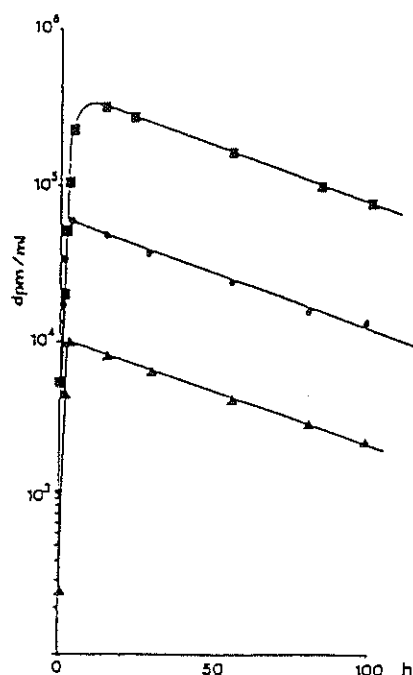


Fig. 3.7 : Décroissance à long terme de la radioactivité dans la fraction insoluble dans le TCA après incorporation de *thymidine à trois doses différentes.
[D'après Servais et coll., 1985]

Un ensemble de mesures de *taux de mortalité* effectuées dans une large variété de milieux aquatiques (eaux côtières, estuaires, fleuves) est rassemblé à la fig. 3.8. La gamme des valeurs observées est de 0.004 à 0.025 h⁻¹. Elle se situe juste au milieu de la gamme des valeurs de taux de croissance spécifique et présente le même type de relation à la température. Cette mortalité est imputable, pour l'essentiel au broutage par le microzooplancton et, pour une faible part, à la lyse des cellules.

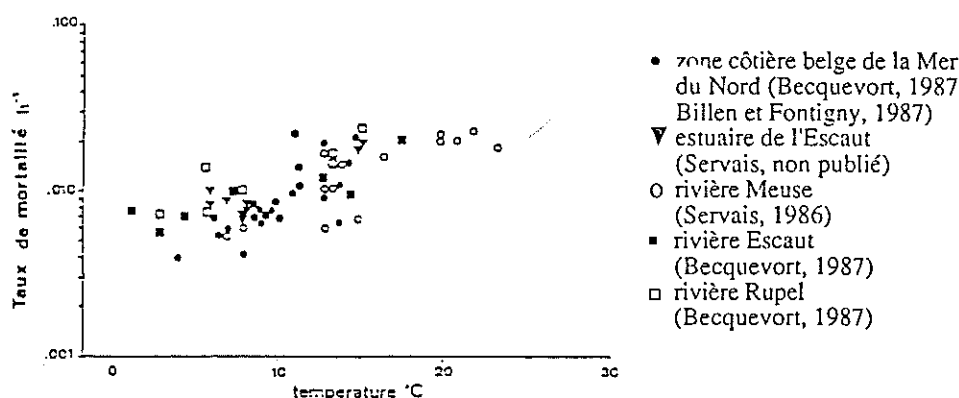


Fig. 3.8 : Taux de mortalité bactérienne dans différents milieux aquatiques naturels, portés en fonction de la température in situ.

□ Le modèle H₃SB de Billen et Servais

L'étude détaillée des processus de base de la dégradation de la matière organique en milieu aquatique et de ses facteurs de contrôle débouche sur une formalisation mathématique du modèle présenté précédemment.

Supposons que la matière organique polymérique est produite ou apportée à une vitesse Σp_i sous forme de biopolymères de i classes d'"utilisabilité" H_i . Ceux-ci seront hydrolysés, chacun selon une cinétique michaelienne propre, par les exoenzymes liées à la biomasse bactérienne. Les substrats monomériques (S) ainsi produits sont prélevés par les bactéries selon une autre cinétique michaelienne. Une fraction $(1-Y)$ de ce prélèvement est oxydée aux dépens d'oxydants extérieurs, le reste (Y) forme de la biomasse bactérienne nouvelle (B). Des enzymes hydrolytiques sont synthétisés proportionnellement à la biomasse. Celle-ci est soumise à une mortalité du premier ordre, que nous supposerons dans un premier temps, due essentiellement au broutage. Les équations d'évolution de H , S et B peuvent s'écrire, en système fermé :

MODELE H₃SB

Variations des teneurs en composés polymériques

$$\frac{dH_i}{dt} = -e_{imax} \frac{H_i}{H_i + K_{H_i}} * B + p_i$$

Variations des teneurs en substrats directs

$$\frac{dS}{dt} = \sum_i \left[\left(e_{imax} \frac{H_i}{H_i + K_{H_i}} \right) * B \right] - \left[b_{max} \frac{S}{S + K_s} * B \right] + p_s$$

Variations des biomasses bactériennes

$$\frac{dB}{dt} = \left[Y * b_{max} \frac{S}{S + K_s} \right] - \left[k_d * B \right]$$

avec e_{imax} et K_{H_i} , respectivement la vitesse maximale et la constante de demi- saturation de l'hydrolyse enzymatique pour chaque classe i de biopolymère par unité de biomasse bactérienne,

b_{max} et K_s , la vitesse maximale par bactérie et la constante de demi-saturation de l'uptake de substrats directs par unité de biomasse bactérienne,

Y , le rendement de croissance,

k_d , la constante de premier ordre de mortalité.

Si l'on discute le modèle en fonction de l'état stationnaire, il prédit que la biomasse bactérienne atteinte est proportionnelle au flux total d'apport de substrats organiques. L'activité hétérotrophe est égale à ce flux. Par contre, à l'état stationnaire, ni la concentration en biopolymères, ni la concentration en substrats directs ne dépendent du flux total de production,

$$\text{Activité organotrophe} = b_{\max} \frac{S}{K_s + S} * B = \sum_j P_j$$

elles dépendent seulement des caractéristiques physiologiques des bactéries. De même, le taux de croissance spécifique des bactéries, à l'état stationnaire, est indépendant du flux d'apport de substrats organiques et est simplement fixé par le taux de "mortalité".

$$\mu = Y b_{\max} \frac{S}{K_s + S} = k_d$$

Le modèle simplifié développé ici conduit donc à cette conclusion paradoxale que *les systèmes eutrophes et oligotrophes, pour autant qu'ils aient atteint leur état stationnaire, ne peuvent se distinguer ni par leur concentration en biopolymères, ni en substrats directs, ni par le taux de croissance des bactéries, mais seulement par la biomasse bactérienne*. Pour autant que l'on puisse considérer que certains écosystèmes naturels soient à l'état stationnaire, cette prédiction du modèle recoupe la réalité des faits. Le modèle de Billen et Servais est de type prédictif et explicatif. Ceci est à l'opposé des modèles que nous allons envisager à présent : plus simples, ils se veulent descriptifs. Ils ont pour but de décrire la distribution des composés organiques (polymériques et solubles) dans l'épaisseur des sédiments. Pour une comparaison des deux approches, laissons la parole à l'auteur principal du modèle précédent (Gilles BILLEN) :

"La démarche développée se caractérise par la volonté de pousser jusqu'au niveau biochimique l'analyse des mécanismes de fonctionnement des microorganismes et des signaux qui les contrôlent.

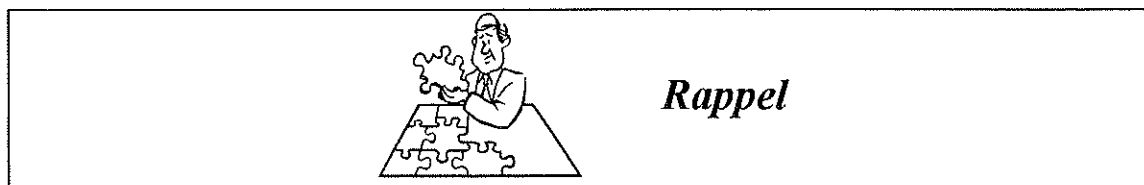
Cette démarche ne relève pas d'un souci purement académique de se référer aux concepts de base de la biologie moléculaire. Elle est dictée, en fait, par la nécessité d'accéder le plus rapidement possible, mais sans simplifications abusives, à l'établissement de modèles opérationnels utilisables comme outils de prévision et de gestion. Elle offre en effet le moyen de relier directement les flux de matière, décrits en terme des principaux constituants chimiques de la matière vivante, à la cinétique des actions enzymatiques qui les engendrent, et permet donc d'appliquer directement les connaissances et les techniques acquises sur la physiologie des microorganismes à l'étude du fonctionnement d'ensemble des milieux naturels. Cette approche court-circuite bien souvent le niveau de l'analyse des relations entre unités taxonomiques dont la distinction ne se justifie que dans la mesure où elle recouvre une différence fonctionnelle significative au niveau du comportement global du système.

Cette démarche se distingue radicalement de l'approche "boîte noire" adoptée dans de nombreux travaux de modélisation écologique. La physiologie des microorganismes est prise en compte de manière simplifiée mais réaliste. C'est en cela que le développement des modèles est tributaire de la mise au point de méthodes de mesure fines du métabolisme des microorganismes dans les conditions naturelles."

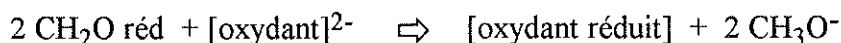
3.2 Modèles géochimiques

3.2.1 Modèle multi-G de Berner et Turekian

Le modèle de Berner et Turekian, élaboré d'après le modèle simple de Berner, est un modèle de type "boîte noire" permettant de décrire la distribution des composés solubles ou figurés dans l'épaisseur des sédiments. Ce modèle ne présuppose aucune connaissance particulière du système.



La transformation biologique de la matière organique polymérique peut s'écrire de manière très schématique:



CH_2O est utilisé comme type de matière organique polymérique subissant une oxydation ; il s'agit de matière particulaire (non soluble), ne pouvant être utilisée comme substrat direct. Il s'agit ici d'un processus global d'oxydoréduction, recouvrant de nombreuses étapes intermédiaires (hydrolyse, uptake, acétogenèse, oxydation, ...) dont est éventuellement responsable une large gamme de microorganismes intervenant simultanément et/ou consécutivement. Chacune de ces étapes suit sa propre cinétique (michaélienne ou non). La description complète et détaillée du système dont il est question ci-dessus, si chaque étape en était connue, impliquerait un travail expérimental considérable de détermination des paramètres, générant un système d'équations si nombreuses et d'une telle complexité que le modèle deviendrait impossible à gérer. On est donc amené à simplifier ce modèle en considérant toutes les étapes intermédiaires sous la forme d'un seul processus s'effectuant dans une "boîte" opaque : on connaît ce qui y entre (flux entrant) et on mesure la "biomasse" dans la boîte et ce qui en sort (flux sortant), sans se préoccuper des étapes intermédiaires. C'est le principe du "**black box model**" fréquemment utilisé pour la modélisation écologique. Un modèle peut-être constitué d'une ou plusieurs "boîte(s)".

L'expression la plus simple de la dégradation, est celle qui considère que la matière organique se dégrade à un rythme proportionnel à sa propre concentration (analogie avec la décomposition radioactive). Défini par Berner, ce modèle s'écrit :

$$\frac{dG}{dt} = -kG \quad [1]$$

avec G , la concentration de matière organique métabolisable (exprimée en masse de C org par unité de masse de sédiment) susceptible d'être oxydée en HCO_3^- et CO_2 .
 k , une constante de dégradation de premier ordre
 t , le temps

Ce modèle, trop simple pour la plupart des applications, a été critiqué et "amélioré" par Jorgensen, Berner, Westrich et Turekian. Dans cette nouvelle version, Jorgensen propose de tenir compte de l'*hétérogénéité de la matière organique*, celle-ci étant composée de molécules plus ou moins labiles et réfractaires, chacune présentant donc une cinétique de dégradation avec un k qui lui est propre. Ainsi, dans le *modèle multi-G*, la matière à dégrader G est scindée en plusieurs classes de composés (G_1, G_2, \dots, G_n), chacun étant dégradé selon une cinétique de premier ordre. Le modèle devient :

$$G = \sum_{i=0}^n G_i \quad [2]$$

$$\frac{dG_i}{dt} = -k_i G_i \quad [3]$$

$$\frac{dG}{dt} = - \sum_{i=0}^n k_i G_i \quad [4]$$

avec G_i et k_i , respectivement les teneurs en C org et les constantes de dégradation de premier ordre pour chaque groupe de composés.

Selon cette formulation, la disparition de certains composés en profondeur dans le sédiment (c'est à dire avec le temps) "suit" leur "réactivité".

Prenons l'exemple d'une matière organique composée de trois fractions α , β et γ , en proportions égales lors du dépôt à la surface du sédiment ($G_{\alpha 0} = G_{\beta 0} = G_{\gamma 0}$) mais avec des constantes de dégradation très différentes (soit $k_{\alpha} \gg k_{\beta} \gg k_{\gamma}$). Dans ce cas on assisterait à la disparition progressive des composés de classe α , suivis de ceux de classe β , puis de ceux de classe γ . Les taux de dégradation de la matière organique, si les k sont suffisamment différents apparaissent égaux à $k_{\alpha} G_{\alpha}$ à proximité de la surface (activité dominante), $k_{\beta} G_{\beta}$ à profondeur moyenne et $k_{\gamma} G_{\gamma}$ à plus grande profondeur dans le sédiment. Dans ce cas, on assiste à une bonne simulation des processus de biodégradation microbienne dans les sédiments, caractérisés par l'*utilisation séquentielle des composés* et la *stratification verticale des réactions* métaboliques (bien démontré tant sur le terrain que in vitro).

Si on intègre ces processus de biodégradation dans l'ensemble des concepts de la diagenèse, en insérant l'équation [3] dans l'équation diagénétique de Berner et en postulant le "steady state", on peut écrire en ne tenant pas compte des phénomènes de bioturbation :

$$-\omega \frac{\delta G_i}{\delta x} - k_i G_i = 0 \quad [5]$$

avec x , la profondeur dans le sédiment, et $\omega (= \delta x / \delta t)$, le taux de sédimentation.

La solution de cette équation, avec les conditions aux limites suivantes

$$\begin{array}{ll} x = 0 & G_i = G_{i0} \\ x \rightarrow \infty & G_i \rightarrow 0 \end{array}$$

peut se formuler comme suit :

$$G_i = G_{i0} \exp \left(- \frac{k_i}{\omega} x \right) \quad [6]$$

En substituant [6] dans [2], on obtient, pour l'ensemble du C org métabolisable :

$$G = \sum_{i=0}^n G_{i0} \exp \left(- \frac{k_i}{\omega} x \right) \quad [7]$$

Cette équation, appliquée à l'exemple des trois classes de composés devient :

$$\begin{aligned} G = G_{\alpha 0} \exp \left(- \frac{k_{\alpha}}{\omega} x \right) + G_{\beta 0} \exp \left(- \frac{k_{\beta}}{\omega} x \right) \\ + G_{\gamma 0} \exp \left(- \frac{k_{\gamma}}{\omega} x \right) \quad [8] \end{aligned}$$

Ce modèle prend en compte le taux de sédimentation, et donc d'enfouissement de la matière organique (déplacement progressif de l'origine de l'axe des x). La représentation des résultats de ce modèle apparaît à la figure 3.9 : la teneur du sédiment en C org métabolisable est portée en fonction de la profondeur (x) dans le sédiment. Les paramètres choisis correspondent à ceux de l'exemple cité plus haut :

$$\begin{array}{lll} G_{\alpha} = G_{\beta} = G_{\gamma} = 200 \mu\text{mol g}^{-1} & G = G_{\alpha} + G_{\beta} + G_{\gamma} = 600 \mu\text{mol g}^{-1} \\ k_{\alpha} = 1 \text{ an}^{-1} & k_{\beta} = 0.1 \text{ an}^{-1} & k_{\gamma} = 0.01 \text{ an}^{-1} \\ \omega = 0.1 \text{ cm an}^{-1} & \text{pas de bioturbation} & \end{array}$$

L'application du modèle multi-G avec ces paramètres donne le profil de teneur en C org représenté à la fig. 3.9 . On remarque la disparition séquentielle des trois classes de composés en fonction de la profondeur dans le sédiment ainsi que l'on doit s'y attendre d'après les observations et mesures dans les sédiments naturels.

La prise en compte des paramètres de sédimentation est importante dans une perspective géochimique (échelle de temps de l'ordre de 10^3 à 10^8 ans) alors que son impact sur les phénomènes écologiques (10^{-1} à 10^2 ans) est minime (et peut donc souvent être négligé).

Toutefois ce modèle est encore trop simple sous deux aspects qui, eux, peuvent avoir une importance fondamentale sur le plan de l'écologie sédimentaire :

- il ne tient pas compte de la formation des géopolymères réfractaires
- il ne tient pas compte de la bioturbation.

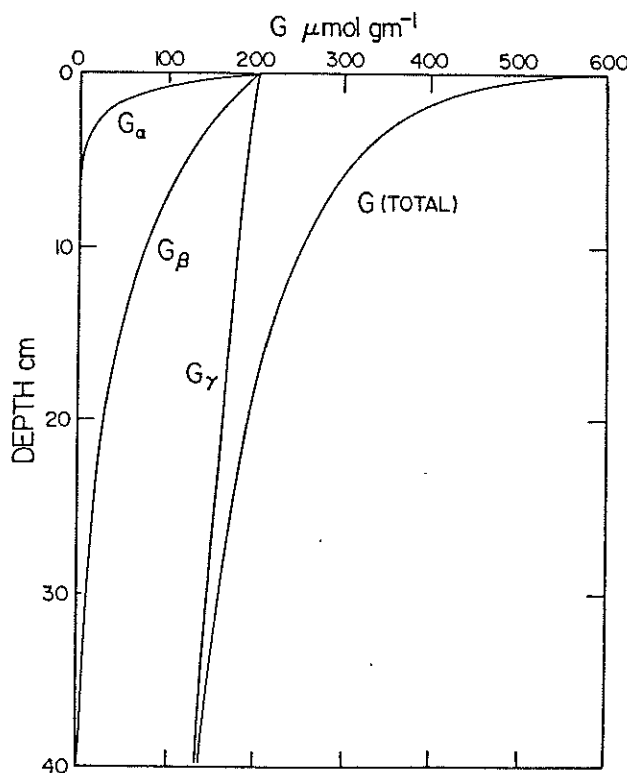


Fig. 3.9
Exemple de calcul de la distribution du C org dans un sédiment théorique à l'aide du modèle multi-G [d'après Berner, 1980]

Dans ce modèle, la matière organique peu réactive (=réfractaire) trouvée en profondeur résulte de la décomposition bactérienne des substrats les plus labiles. Si ceci est partiellement exact, on sait également que s'effectuent, au sein des sédiments des réactions abiotiques de transformation des composés organiques en *géopolymères* (acides humiques, fulviques et kérogène). Dans ce cas, le modèle devrait se compliquer de termes additionnels, rendant compte de ces transformations. Dans la pratique, et dans une perspective écologique, il suffit souvent de prendre en compte une fraction hypothétique G_r , absolument réfractaire (ne subissant aucune biodégradation). Cet artifice permet, dans la plupart des cas de rendre compte de la distribution du C org dans l'épaisseur du sédiment. La prise en compte de la *bioturbation* est un peu plus compliquée. Rappelons que la bioturbation est l'ensemble des phénomènes de mélange des couches superficielles des sédiments, lié à l'action de la macrofaune. Ce mélange s'effectue dans une zone corticale des sédiments d'épaisseur L , de quelques millimètres à environ un mètre. On peut l'assimiler, dans une première approche à un phénomène comparable à la diffusion (tendant à homogénéiser un certain volume), et sera donc traitée sous forme d'une constante de diffusion, D_b .

Si on postule que les composés les plus labiles (G_α , affectés d'une constante de dégradation k_α), sont essentiellement trouvés (et dégradés) dans cette couche superficielle d'épaisseur L , et que les composés G_β le sont essentiellement dans la zone sous-jacente (concentration constante dans les couches superficielles), on peut proposer l'équation suivante pour la distribution de G_α dans les couches corticales des sédiments :

$$D_b \frac{\delta^2 G_\alpha}{\delta x^2} - \omega \frac{\delta G_\alpha}{\delta x} - k_\alpha G_\alpha = 0 \quad [9]$$

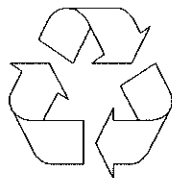
avec D_b , le coefficient de "diffusion" lié à la bioturbation et ω , le taux de sédimentation.

L'équation [9] admet comme solution avec les conditions aux limites suivantes :

$$\begin{array}{ll} x = 0 & G_\alpha = G_{\alpha 0} \\ x \rightarrow \infty & G_\alpha \rightarrow 0 \end{array}$$

$$G_\alpha = G_{\alpha 0} \exp \left\{ \left(- \frac{\omega - (\omega^2 + 4k D_b)^{1/2}}{2D_b} \right) x \right\} \quad [10]$$

L'équation [10] s'applique aux strates telles que $x \leq L$. Pour $x > L$, il n'y a plus de bioturbation et l'équation générale [5] s'applique.



FIN DU RAPPEL

Pour appliquer le modèle multi-G de manière satisfaisante, il est nécessaire de connaître le nombre de classes de composés labiles à prendre en compte. Or les informations que l'on peut utiliser pour ce choix sont loin d'être suffisantes et le modèle multi-G ne précise pas le nombre de classes de composés à considérer pour la modélisation. Ceci a conduit à appliquer ce modèle selon deux modalités, l'une connue sous le nom de "Quantum-G" implique un nombre déterminé de classes de composés, l'autre considère une infinité de classes et le constante k devient une fonction de t (voir le modèle de Middenburg ci-après).

En pratique, dans une optique écologique (échelle de temps de l'ordre de 10^{-1} à 10^2 ans), le modèle Quantum-G met en jeu 3 classes de composés : G_1 est extrêmement labile et

dégradé en conditions aérobiques, G_2 , plus résistant est dégradé plus profondément, en conditions anaérobiques et G_3 est considéré comme typiquement réfractaire. Dans une optique géochimique (échelle de temps de l'ordre de 10^3 à 10^8 ans), on peut aller jusqu'à envisager 8 composés, dépendant de la précision souhaitée. En général, la détermination des proportions et de la réactivité k des classes de composés envisagés implique une analyse graphique relativement imprécise. Ainsi, il faudrait considérer les paramètres du modèle comme des *valeurs ajustées aux mesures expérimentales* et non des constantes représentant une réalité biologique. On peut toutefois essayer de "raccrocher" les paramètres k de dégradation aux caractéristiques connues de la dégradation enzymatique. La dégradation enzymatique d'un composé organique α obéit à une cinétique michaelienne :

$$\frac{dC_\alpha}{dt} = \frac{-V_{\max} C_\alpha}{K_{m_\alpha} + C_\alpha} \quad [11]$$

avec C_α , la concentration de α ; V_{\max} , la vitesse maximale de réaction ;
 K_m , la constante de Michaelis

Du point de vue de la modélisation, il serait nécessaire de déterminer les V_{\max} et K_m de toutes les réactions et de tous les intermédiaires, ce qui, à l'heure actuelle apparaît impossible. Toutefois, si on postule que *l'ensemble du processus* obéit à une cinétique michaelienne, on aurait :

$$G_\tau = \sum G_i \quad [12]$$

$$\frac{dG_\tau}{dt} = - \sum_{i=1}^n \left(\frac{V_{\max} G_i}{K_{m_i} + G_i} \right) \quad [13]$$

Si nous posons comme hypothèses que *le nombre de classes de composés G_i significatifs est petit et que les $K_{m_i} \gg G_i$* , on peut considérer $K_{m_i} + G_i \approx K_{m_i}$.
 On a donc :

$$\frac{dG_\tau}{dt} = - (k_1 G_1 + k_2 G_2 + \dots + k_i G_i + \dots + k_n G_n) \quad [14]$$

avec $k_i = V_{\max}/K_{m_i}$

On voit donc que, moyennant les quelques hypothèses formulées précédemment, les constantes de biodégradation k peuvent trouver une interprétation biologique tirée des cinétiques enzymatiques.

3.2.2 "Power model" de Middelburg

Dans le modèle Quantum-G discuté auparavant, la matière organique est donc supposée constituée d'une fraction réfractaire et d'une ou plusieurs fraction(s) labile(s). *La distinction entre composés labiles et réfractaires est très subjective et dépend, d'une part de l'échelle de temps considérée* (ATP, protéines, hydrocarbures et acides humiques sont tous dégradables, depuis l'échelle de la minute à celle du millénaire !), *et, d'autre part, de l'environnement considéré* (les lipides sont très rapidement dégradés en aérobiose et résistent très longtemps en anaérobiose, par exemple). De plus les résultats des campagnes de forages profonds (Deep Sea Drilling Project, ...) ont montré que la matière organique était réactive à toutes profondeurs au sein des sédiments, toutefois, cette réactivité diminue continuellement avec le temps. Il apparaît donc nécessaire de tenir compte de cette caractéristique dans le modèle.

Middelburg a proposé de modifier le "Quantum-G" en *faisant varier de façon continue le paramètre k en fonction du temps*. On a donc

$$\frac{dG_t}{dt} = -k(t) G_T \quad [15]$$

avec G_T , la concentration en C org total et $k(t)$, un paramètre de premier ordre, sous forme d'une fonction du temps

Si on suppose que $k(t)$ reste constant sur un intervalle Δt , k peut être calculé à l'aide de la formule suivante :

$$k = \frac{1}{\Delta t} \ln \left(\frac{G_t}{G_{(t+\Delta t)}} \right) \quad [16]$$

avec G_t , la concentration en C org à un temps donné

Prenons un exemple de ce calcul. Les données de Westrich & Berner et de Poulicek, Dave & Nisin relatives à la biodégradation aérobique du plancton ont été utilisées pour ce calcul (à noter que ces données ont également été utilisées par Westrich et Berner pour valider leur "Quantum-G model"). Les périodes d'échantillonnage ont été choisies comme Δt et le point médian de chaque intervalle pour t . Les constantes de vitesse calculées sont reportées en fonction du temps à la figure 3.10. La tendance à la décroissance de k en fonction du temps y apparaît nettement (attention : échelles bilogarithmiques). Le coefficient de corrélation de la droite de régression est de 0.997 pour l'équation :

$$\log k = -1.26 (\pm 0.05) \log t - 0.95 (\pm 0.04) \quad [17]$$

avec t exprimé en années.

Puisque la réactivité de la matière organique décroît avec le temps, Middelburg a testé son hypothèse de travail à partir d'échantillons couvrant une échelle de temps géologique. Il a utilisé les valeurs (publiées) de teneurs en C org dans des carottes

prélevées en différents endroits où le taux de sédimentation ou l'âge du matériel étaient connus. En utilisant les profondeurs dans le sédiment comme indicateurs de l'âge et en appliquant la formule [16], il est arrivé à élaborer le graphique de la figure 3.11. Il est assez surprenant de voir comme les résultats "collent" bien à l'hypothèse proposée, alors que les sites de récolte des échantillons, les modes de mesure (terrain ou laboratoire) sont si différents et que de nombreux paramètres sont supposés, a priori, peu significatifs (origine du C org, bioturbation, pression, température, potentiel redox, ...). La régression linéaire des valeurs calculées par rapport au temps (exprimé en années) donne une corrélation de 0.987 (N=140). L'équation de cette droite est :

$$\log k = -0.95 (\pm 0.01) \log t - 0.81 (\pm 0.04) \quad [18a]$$

$$\text{soit encore} \quad k = 0.16 t^{-0.95} \quad [18b]$$

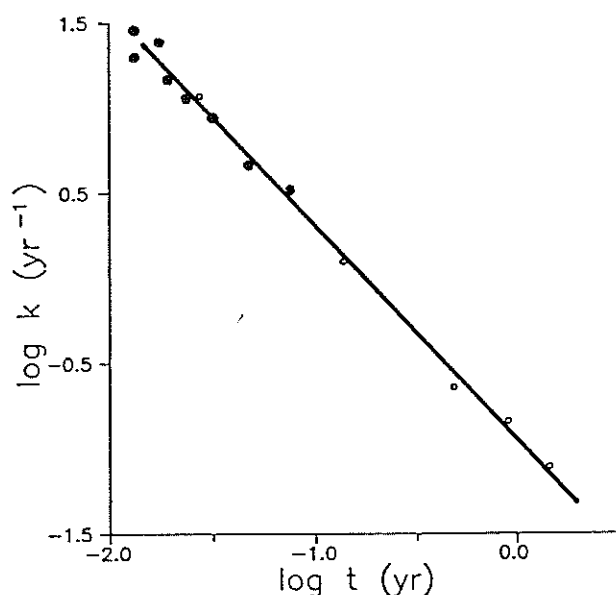


Fig. 3.10 Evolution de la réactivité du Corg en fonction du temps. Dégradation aérobie du plancton marin.

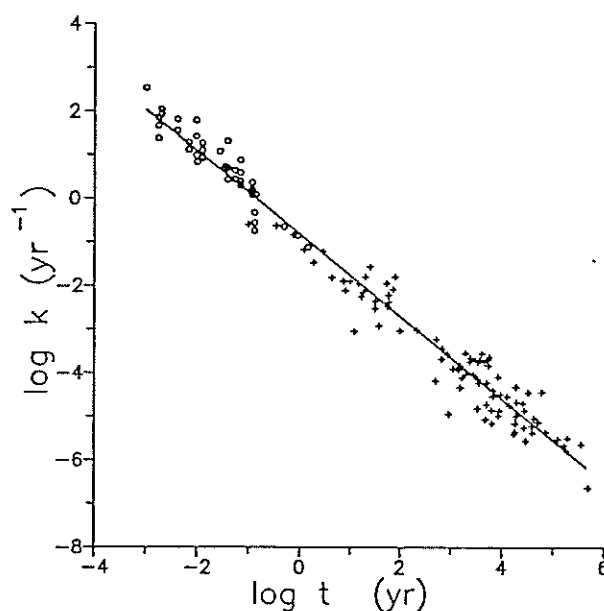


Fig. 3.11 Evolution de la réactivité du C org au cours du temps. Echantillons sédimentaires provenant de carottages et mesures in vitro

Les résultats repris à la fig. 3.11 impliquent qu'il y a une *décroissance régulière du coefficient de réactivité de la matière organique sur plus de huit ordres de grandeur du temps*. La très bonne corrélation entre la droite de régression et les valeurs calculées du k indiquent par ailleurs qu'il n'y a pas de différence significative entre les mesures des taux de réactivités au laboratoire et ceux mesurés in situ dans des sédiments correctement datés, que ces milieux soient aérobies ou anoxiques. La régression calculée à partir des seules données acquises en laboratoire

$$\log k = -1.00 (\pm 0.06) \log t - 0.84 (\pm 0.10) \quad R = 0.93 \quad N = 46 \quad [19a]$$

est très proche de celle calculée à partir des seules données de terrain

$$\log k = -0.88 (\pm 0.03) \log t - 1.05 (\pm 0.10) \quad R = 0.95 \quad N = 94 \quad [19b]$$

Bien que toutes les mesures de k effectuées à partir de données de terrain suivent la même tendance, le point de départ ("*âge initial apparent*") est différent. Par exemple, les échantillons néritiques et océaniques de l'océan Pacifique suivent tous deux la tendance décrite par l'équation [18], mais "démarrent" avec une valeur de k , près de la surface du sédiment, différente, les échantillons de la province océanique ayant un "âge initial apparent" plus élevé que ceux de la province néritique. Par analogie avec les processus de formation des sols humifères forestiers, on peut tenir compte de cette observation en introduisant le paramètre d'âge initial apparent dans l'équation [18]

$$k = 0.16 (a + t)^{-0.95} \quad [20]$$

avec a , l'âge initial apparent, et t , le temps écoulé depuis le début de la dégradation.

Comme, en général, $t \gg a$, l'âge initial apparent peut être déterminée par

$$G_{t1} = G_{t0} \exp 3.2 (a^{0.05} - (a + t_1)^{0.05}) \quad [21]$$

avec G_{t0} , la teneur en C org au début de l'expérience ou à l'interface sédimentaire,

G_{t1} , la teneur en C org dans le premier prélèvement expérimental ou dans l'échantillon juste sous l'interface sédimentaire.

L'équation [21] est obtenue en substituant [20] dans [15] suivi de l'intégration.

L'âge initial apparent calculé pour quelques échantillons figure dans le tableau ci-dessous.

<i>Matériel expérimental</i>	<i>a (jours)</i>	<i>Références</i>
Plancton marin (Pacifique)	0.09	Westrich & Berner, 1984
" " (Méditerranée)	0.02 - 0.10	Poulicek, n. publ.
" " (mer du Nord)	0.04 - 0.15	Poulicek, n. publ.
MOP (")	4.50 - 24.90	Poulicek, n. publ.
Algues	0.68	Henrichs & Doyle, 1986
Bactéries	1.69	Henrichs & Doyle, 1986
Boues activées (stations d'épuration)	4.20	Grunseich & Duedall, 1978
<i>Echantillons sédimentaires</i>	<i>a (années)</i>	<i>Références</i>
Cape Lookout Bight	0.26	Martens & Klump, 1984
Saanich Inlet	2.5	Murray et al., 1978
Séd. mer du Nord	2.1 - 9.8	Poulicek, n. publ.
Séd. Méditerranée	4.9 - 15.7	Poulicek, n. publ.
Buzzards Bay	6.3 - 9.5	Henrichs & Farrington, 1987
Pacifique sud-ouest	93 - 1400	Reimers & Suess, 1983
Plaine abyssale de Hatteras	780 - 5300	Heggie et al., 1987
Plaine abyssale du Pacifique central	14000 - 35000	Muller & Mangini, 1980

3.2.3 Modèle de Wollast de recyclage des nutriments azotés

La dégradation bactérienne de la matière organique dans les couches superficielles des sédiments marins s'accompagne de la *mise en solution*, dans l'eau interstitielle, de *nutriments* tels que NO_3 , NH_4 , PO_4 , ... L'élimination de la matière organique s'accompagne également d'une "mise à nu" des formations squelettiques de leurs gangues protectrices et permet la *dissolution de la phase minéralisée* de ces squelettes si ceux-ci sont en déséquilibre avec le milieu. C'est le cas, par exemple, de l'opale des frustules de diatomées qui se dissout en libérant de l'acide silicique. La dégradation bactérienne étant un processus oxydatif, elle s'accompagne de la *consommation des divers oxydants présents* dans l'eau interstitielle, en respectant les impératifs énergétiques imposés par la thermodynamique (successivement : O_2 , nitrates et nitrites, MnO_2 et FeO_3 puis sulfates). Ces réactions affectent la *composition des eaux interstitielles* qui s'enrichissent en substances nutritives et s'appauvrissent en substances oxydantes. L'existence de *gradients de concentration* dans les eaux interstitielles provoque un *flux de matière* dans le sens opposé aux gradients de concentration, en particulier à l'interface entre le sédiment et les eaux libres sus-jacentes. La différence de concentrations entre les eaux interstitielles et l'eau libre conduit à un échange de matière permettant, notamment, de *recycler une partie des substances nutritives* déposées lors de la sédimentation. De même, le sédiment "consomme" des substances oxydantes fournies par l'eau de mer ("respiration" du sédiment).

La modélisation mathématique de ce processus implique la détermination des différents flux de transformation des composés impliqués (taux d'ammonification, de nitrification et de dénitrification, ...) au sein du sédiment et entre l'eau interstitielle et l'eau libre.

On sait que les changements de concentration C d'une espèce dissoute (par exemple l'ion ammonium) dans un volume unitaire d'épaisseur dz est donnée par :

$$\frac{\delta C}{\delta t} = \frac{\delta}{\delta z} \left(D \frac{\delta C}{\delta z} \right) - \omega \frac{\delta C}{\delta z} + r \quad [22]$$

(équation diagénétique générale de Berner)

avec D , un coefficient de "diffusion"
 ω , le taux de sédimentation,
 r , l'ensemble des transformations affectant l'espèce considérée dans le volume délimité par dz (processus chimiques, physiques et biologiques de production, consommation, ... sous forme d'un bilan net).

Exception faite des sites à très haut taux de sédimentation (estuaires, ...) le terme advectif $-\omega (\delta C / \delta z)$ peut être négligé en ce qui concerne les espèces dissoutes. Et puisque les constantes de vitesse et les conditions aux limites peuvent être considérées comme indépendantes du facteur temps, le système est à l'équilibre et peut donc se simplifier en :

$$D \frac{\delta^2 c}{\delta z^2} + r = 0 \quad [23]$$

Finalement, le flux F de l'espèce dissoute au niveau de l'interface sédimentaire est aisément calculé à partir des gradients de concentration de cette espèce dans l'eau interstitielle proche de l'interface :

$$F = -D \left(\frac{dC}{dz} \right)_{z=0} \quad [24]$$

Ceci permet, par exemple de calculer le flux d'azote régénéré depuis les sédiments vers la colonne d'eau à condition d'avoir pu évaluer le paramètre D , intégration complexe de la diffusion moléculaire, de l'influence des ondes de pression de la houle, du remaniement des grains sédimentaires par les courants, de la bioturbation, ... En général, cette opération s'effectue par ajustement du modèle à des données expérimentales.

Si la vitesse d'une réaction in-situ est connue avec une bonne précision, il est possible d'évaluer le coefficient D de "diffusion" verticale si on connaît également le profil de distribution du produit de la réaction dans les couches superficielles du sédiment. Ainsi, le taux d'ammonification p dans les sédiments de la mer du Nord a été déterminé en fonction de la profondeur. Il a été trouvé constant dans la couche superficielle de 3 cm d'épaisseur, et négligeable dans les couches sous-jacentes. L'équation gouvernant le processus est donc :

$$\frac{\delta C}{\delta t} = D \frac{\delta^2 C}{\delta z^2} + p \quad [25]$$

$$\text{avec } p = 1.2 \cdot 10^{-6} \text{ } \mu\text{mol/cm}^3 \text{ pour } 0 < z \leq 3 \text{ cm} \\ p = 0 \text{ pour } z > 3 \text{ cm}$$

Si on postule le steady state et si z_a représente la zone dans laquelle l'ammonification est effective, on obtient la solution de l'équation différentielle en intégrant, ce qui donne :

$$C = -\frac{p}{2D} z^2 + \frac{pz_a}{D} z + C_0 \quad \text{pour } 0 < z < z_a \quad [26a]$$

$$\text{et} \quad C = C_0 + \frac{pz_a^2}{2D} \quad \text{pour } z > z_a \quad [26b]$$

avec C_0 , la concentration à l'interface ($z = 0$).

On a représenté, à la figure 3.12 (en haut), quatre profils théoriques de la distribution de NH_4 correspondant à quatre valeurs de D (de 0.6 à $1.5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{sec}$). La meilleure corrélation avec les valeurs mesurées in-situ est obtenue avec la valeur $D = 0.85 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{sec}$. Ceci permet une remarquable précision dans la détermination des coefficients de mélange. La même approche peut être effectuée dans le cas du nitrate. Les résultats sont

représentés à la figure 3.12 (en bas). Le coefficient ajusté aux mesures expérimentales est, ici de $0.80 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{sec}$, ce qui constitue une excellente vérification des calculs précédents.

A l'inverse, si le coefficient de mélange peut être obtenu par d'autres approches (par exemple en mesurant la cinétique d'incorporation d'éléments radioactifs déposés à l'interface), la même approche par ajustement peut être utilisée pour déterminer les taux de production d'un métabolite au niveau des couches superficielles des sédiments (Fig. 3.13).

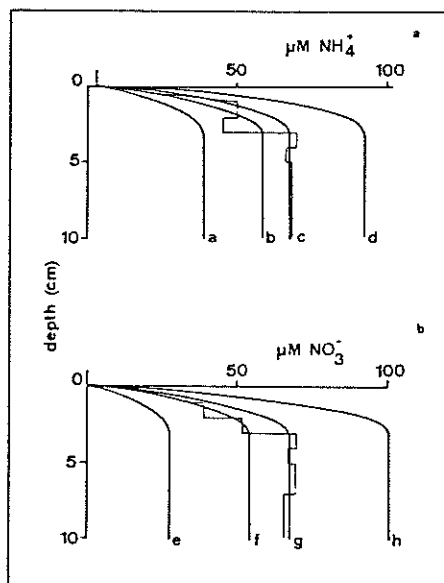


Fig. 2.12 Distributions mesurée et calculées NH_4 et NO_3 dans un sédiment sableux de la mer du Nord à l'aide de différentes valeurs de D .

a : $1.5 \cdot 10^{-4}$; b : $1.0 \cdot 10^{-4}$; c : $0.8 \cdot 10^{-4}$;
d : $0.6 \cdot 10^{-4}$; e : $2.0 \cdot 10^{-4}$; f : $1.0 \cdot 10^{-4}$;
g : $0.8 \cdot 10^{-4}$; h : $0.5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 / \text{sec}$.

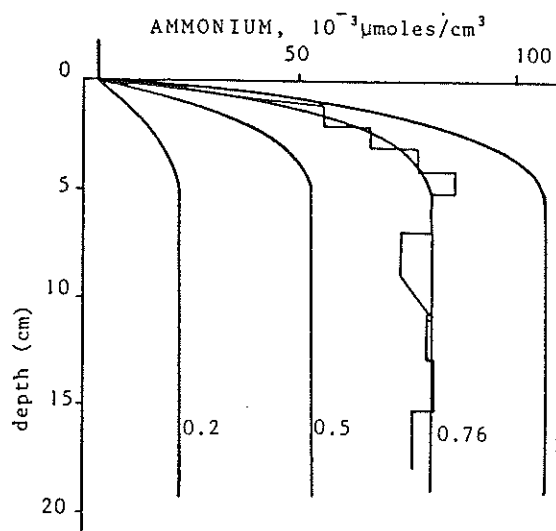


Fig. 2.13 Evaluation théorique du taux d'ammonification. Simulation à l'aide de différentes valeurs de p (en $10^{-6} \mu\text{mol} / \text{cm}^2 / \text{sec}$)

A partir des valeurs mesurées et/ou calculées il est alors possible de calculer les flux de nutriments diffusant depuis l'eau interstitielle vers l'eau libre, la "respiration" du sédiment, etc. Ces flux, en combinaison avec les constantes d'activité déterminées pour les réactions au sein du sédiment (nitrification, ammonification, ...) permettent, par exemple, d'établir le box modèle décrivant le devenir de l'azote dans les sédiments de la mer du Nord et la régénération des nutriments azotés depuis l'interface sédimentaire.

4.- POLLUTIONS ET BIODEGRADATION

" La pollution nous enserre, évidente, monstrueuse, choquante ou subtile, insidieuse, empoisonnante. Elle n'est pas toujours apparente. Elle n'en est pas moins dangereuse. Si les flacons de détergents échoués sur la plage étaient faits dans une matière plastique dégradable, c'est-à-dire susceptible d'être rapidement détruite dans l'eau par des réactions chimiques ou biologiques, on ne les retrouverait pas sur la grève et la pollution aurait, en apparence disparu. Pourtant leur présence aujourd'hui témoigne de l'existence de courants qui ramènent vers les plages les eaux de rivières ou de canaux voisins où poubelles et égouts sont déversés, des eaux insalubres dont la pollution sournoise est celle de traces infimes de substances toxiques, de virus et de bactéries invisibles, sources de maladies infectieuses. [...]

Emportés vers les rivières, par les eaux souterraines ou les égouts, transportés par les vents des cités humaines vers la mer ou déversés directement au large, les polluants peu à peu prennent le chemin de l'océan, réceptacle ultime de nos déchets, l'océan fragile et incompris." [J. NIHOUL, 1972]

La situation ne s'est pas vraiment améliorée en vingt ans !

Dans la suite de ce chapitre, nous envisagerons les modalités de la biodégradation de quelques uns de ces "polluants" évidents ou insidieux, et les répercussions de ces phénomènes sur les écosystèmes naturels et les activités humaines. Nous serons évidemment contraint d'effectuer des choix quant aux matières à traiter.

"Autrefois, l'environnement semblait appartenir à la nostalgie des poètes, des sociétés aimables et désuètes préoccupées d'oiseaux rares et de papillons curieux, ou aux croisades de savants pittoresques défenseurs d'espèces en voie de disparition. Aujourd'hui, chacun est concerné. L'écosystème est menacé." [Ibid.]

4.1 Biodégradation des effluents domestiques

L'eau consommée pour satisfaire nos besoins domestiques retournent, polluées aux cours d'eau, et, de là, aux océans. On retrouve dans les eaux usées domestiques de nombreuses substances issues des diverses activités ménagères. La composition des eaux usées domestiques varie selon son origine (Fig. 4.1).

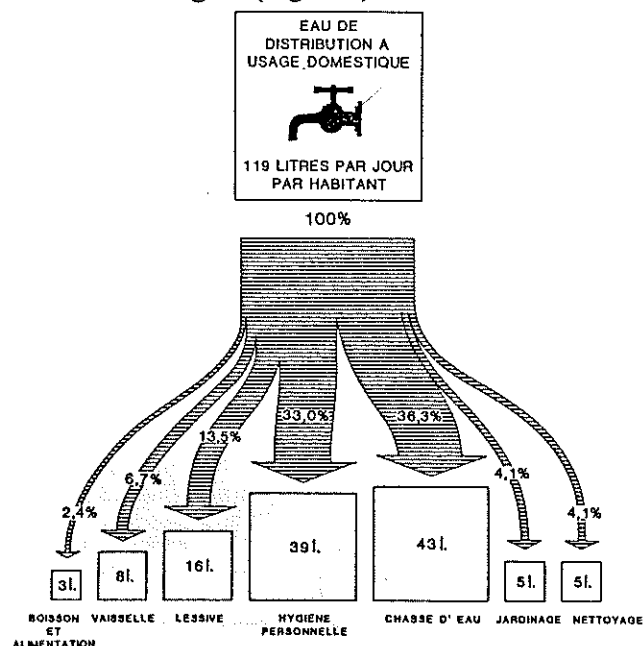


Fig. 4.1 Consommation domestique en eau de distribution en Wallonie (en 1980, source : Commission interministérielle de l'eau).

En 1989, la consommation atteint 182 l/j/hab.

Dans la constitution des effluents domestiques, on distingue habituellement les eaux vannes et les eaux ménagères.

♦ *Les eaux vannes*

Elles sont issues des W-C, leur volume journalier est d'environ 43 litres/j/usager. Elles contiennent essentiellement des matières organiques qui représentent environ 1/3 de la pollution de l'ensemble des eaux usées domestiques. Au plan sanitaire, ces eaux présentent une charge bactériologique très élevée, constituée par les germes de la flore intestinale. Leur nombre peut atteindre $10^{10}/100$ ml d'eau vanne. Cette contamination fécale sort du cadre strict de la biodégradation et ne sera donc pas envisagée ici, bien qu'elle constitue un volet important de la pollution des eaux côtières avec des répercussions immédiates sur la santé publique (eaux de baignade et consommation de fruits de mer).

♦ *Les eaux ménagères*

Les eaux ménagères trouvent leur origine dans les autres utilisations domestiques de l'eau et sont principalement constituées par les eaux de bains et douches (39 l/j/hab), les eaux de cuisine (lave-vaisselle, eaux issues de machines à laver le linge, ... env. 29 l/j/hab). Leur volume varie très sensiblement selon le type de collectivité concernée : de moins de 100 l/hab/jour en milieu rural à plus de 300 l/hab/jour pour les grandes villes en Europe occidentale, beaucoup plus aux USA. Ces eaux contiennent des matières organiques ainsi que des produits d'entretien ménagers, et, en particulier, divers détergents.

Pour éliminer ces divers polluants, les eaux usées domestiques peuvent être envoyées dans une station d'épuration qui a pour rôle de traiter l'eau polluée afin qu'elle soit "écologiquement" acceptable. Le volume déversé varie énormément en fonction des agglomérations prises en compte et le niveau de traitement des eaux varie fortement d'un pays à l'autre, voire même d'un bout à l'autre des côtes d'un même pays (Fig. 4.2).

On peut remarquer que la ville de Londres a récemment fait d'énormes efforts d'assainissement des eaux de la Tamise, se répercutant sur la qualité des rejets en mer du Nord. A l'inverse les villes écossaises (Edinburgh, ...) rejettent à la mer des effluents non ou peu épurés, ce qui se ressent sur la qualité des eaux côtières (Fig. 4.3)

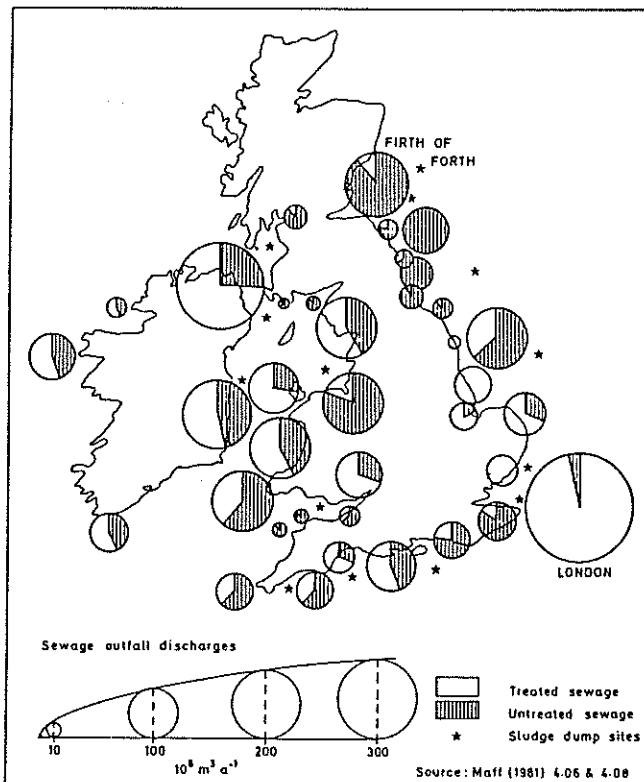


Fig. 4.2 Distribution des effluents domestiques le long des côtes britanniques : volume de la décharge et proportions des effluents épurés.

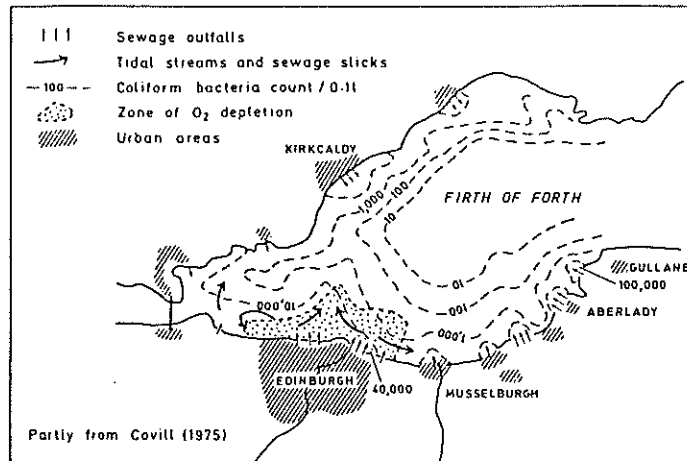


Fig. 4.3 Pollution du Firth of Forth par les rejets urbains non traités de la ville d'Edinburgh

4.1.1 Stations d'épuration littorales et rejets urbains

Pour épurer des eaux usées, on procède sélectivement en quatre étapes, en éliminant au fur et à mesure que le traitement avance, des éléments de plus en plus discrets.

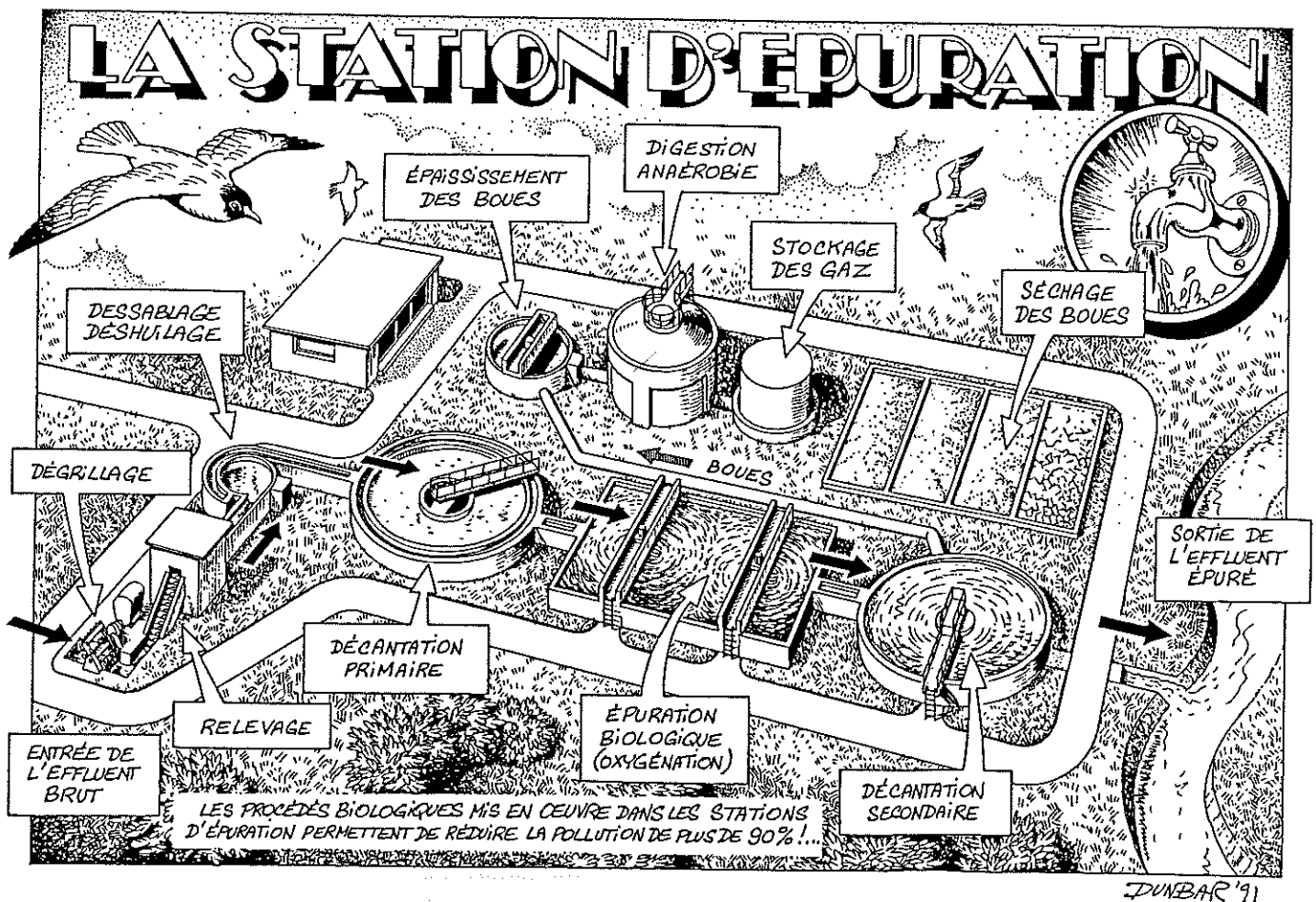


Fig. 4.4 Schéma d'une station d'épuration "classique" des effluents domestiques.

♦ Le **prétraitement** est la première étape. Il a pour but d'éliminer les gros déchets. Le **dégrillage** en est habituellement la première étape et consiste à faire passer l'effluent à travers une grille à barreaux retenant les gros déchets en suspension et les corps flottants (bois, feuilles, bouteilles, ...). Après le dégrillage, les eaux usées traversent un **dessableur** où la vitesse d'écoulement est ralentie de manière à laisser se déposer les matières inorganiques les plus lourdes.

♦ Le **traitement primaire** a pour but d'éliminer par sédimentation les particules organiques décantables en suspension dans les eaux usées. Cette opération, pratiquée dans le **bassin de décantation** permet de recueillir entre 40 et 66 % des matières en suspension et d'abaisser la DBO de l'effluent de 30 % environ. La boue qui en résulte est pompée dans des tours de **fermentation anaérobie** où s'effectue une dégradation biologique à 35°C en conditions anoxiques produisant des gaz putrides dont environ 60 à 85 % de **méthane** assurant la source d'énergie principale de la station elle-même.

♦ Le **traitement secondaire** constitue la principale phase d'épuration biologique. Cette technique d'épuration ne fait que maîtriser, accélérer, concentrer et confiner les procédés de biodégradation biologique naturels. Il consiste à transformer les déchets organiques en suspension ou en solution en nutriments et composés simples (CO_2 et H_2O) et en biomasse bactérienne. Dans le(s) **bassin(s) d'activation biologique**, les microorganismes trouvent les conditions optimales pour leur multiplication et leur activité hétérotrophe ($1 \text{ à } 4 \cdot 10^{10}$ bact/ml). Les souches les plus abondantes appartiennent aux genres *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* et *Pseudomonas*. Ce traitement des effluents peut s'effectuer en suspension (**boues activées** par insufflation d'air sous pression), dans des **lits bactériens** au fonctionnement analogue aux filtres d'aquarium, ou au niveau de **disques biologiques** d'utilisation plus récente. A ces véritables réacteurs microbiologiques fait suite un décanteur secondaire qui retient la "boue" (bactéries). Celle-ci, une fois séchée peut, si elle s'avère exempte de micro polluants, être utilisée pour l'amendement des sols agricoles (29 % pour la CEE, moins de 5 % en Belgique). Le reste est soit déversé en décharges contrôlées (45 %), incinéré (7 %) ... ou déchargé en mer (19 %, voir fig. 4.2 sites de "dumping" pour les îles Britanniques). Cette décharge en mer est loin d'être innocente : au large de New York, ce sont plus de 10 millions de tonnes qui sont déversées annuellement, ... ce qui représente l'apport de "sédiments" le plus important de toute la côte nord américaine. Ces "sédiments" riches en fraction fine ont adsorbé de grandes quantités de polluants (métaux lourds, cycles aromatiques chlorés, hydrocarbures, ...) dont les répercussions sont potentiellement sévères sur les biocénoses, sans parler de l'altération de la granulométrie du sédiment (donc des caractéristiques physicochimiques de l'eau interstitielle), de l'augmentation importante de la turbidité, ...

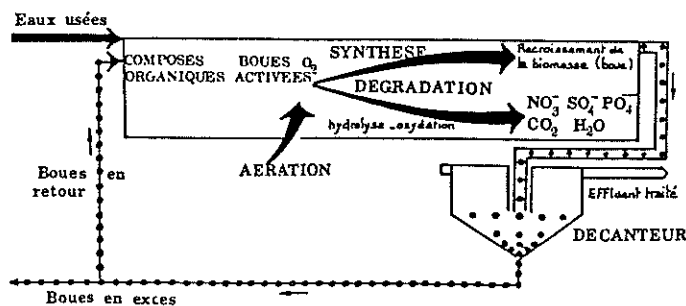


Fig. 4.4 Schéma de principe d'un bassin de traitement secondaire à boues activées.

Cette eau, relativement épurée (diminution de la DBO de plus de 90 %), est le plus souvent celle qui est rejetée dans le milieu naturel. Si elle a été débarrassée de la plus grande partie des composés organiques initialement présents, cette eau s'est toutefois *enrichie en nutriments* (surtout azotés et phosphates), contient toujours de nombreux *germes bactériens éventuellement pathogènes* et l'essentiel de ses *micropolluants* (métaux lourds et pesticides).

♦ Un *traitement tertiaire* devrait s'imposer. Mais, compliqué et assez coûteux, il est souvent réservé à la seule eau de consommation. Ce traitement fait appel à des procédés physicochimiques de séparation des colloïdes par floculation puis centrifugation, adsorption des micropolluants sur charbon activé, précipitations sélectives des nutriments et désinfection par chloration ou ozonisation.

Les effluents rejetés à la mer ont rarement droit à autant ... d'égards.

4.1.2 Biodégradation des lessives et détergents

Quel est le prix à payer pour obtenir un blanc plus blanc que blanc ?

L'industrie des savons et des détergents est l'une des cibles favorites des mouvements écologistes qui lui reprochent d'être particulièrement dangereuse pour l'environnement aquatique. Il est vrai qu'avec les millions de tonnes de produits de lessive vendus dans le monde, cette industrie déverse, par notre intermédiaire, une quantité considérable de produits chimiques plus ou moins toxiques dans nos eaux. Nous ne nous étendrons pas sur la controverse des phosphates, (trop) médiatisée ces derniers temps, et qui a récemment abouti à la condamnation des deux parties (Rhône-Poulenc et Henkel). La toxicité des lessives, particulièrement difficile à cerner, fait couler beaucoup d'encre et suscite une importante polémique.

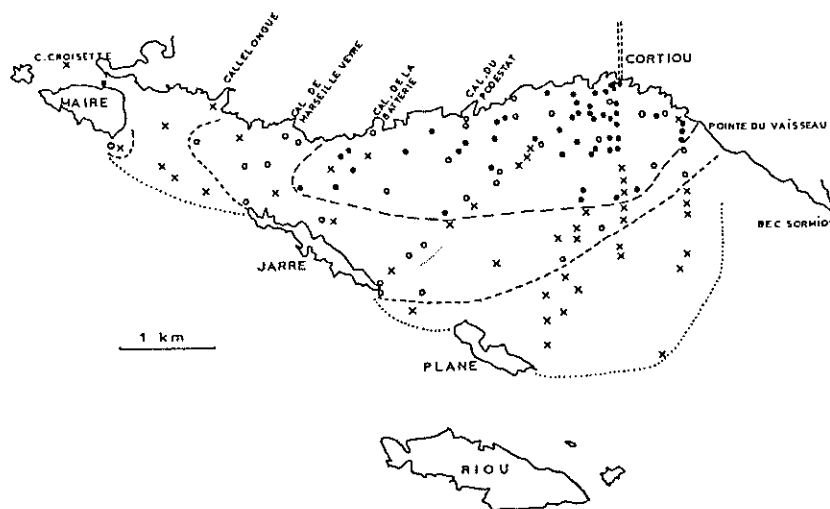


Fig. 4.5 Concentration en détergents anioniques des eaux au large de l'égout de Marseille (Cortiou) en 1983. Les concentrations sont proches du seuil de toxicité aiguë pour les biocénoses.

[● > 100 µg/l ; ○ 50 à 100 µg/l ; x 20 à 50 µg/l]

Le tableau ci-après présente le contenu habituel d'une poudre à lessiver active à toute température. Une dizaine de composés jouent un rôle plus ou moins important dans l'efficacité du produit final. Certains sont plus utiles pour la publicité que pour l'efficacité du lavage (azurants optiques, colorants, parfums, ...). D'autres sont vraiment indispensables (détergents, adoucisseurs, agents de blanchiment).

Tableau 4.1 Composition d'une lessive (les proportions varient dans une large mesure).

GROUPES DE COMPOSANTS	EXEMPLES DE COMPOSES
Substances tensioactives (détergents)	Sulfonates d'alkylbenzène, savons, Alkylphénol éthoxylates
Adjuvants de lavage (adoucesseur)	Phosphates, acide nitrilotriacétique, zéolithes, citrates
Agents de blanchiment	Perborates, percarbonates
Renforceur de blanchiment	Tétracétyléthylène diamine
Adjuvants alcalins	Soude, silicates
Sel neutre (ballast)	Sulfate de sodium
Agents anti-redéposition	Carboxyméthylcellulose, polycarboxylates
Protecteurs de fibres	Phosphonates
Inhibiteurs de mousse	Silicones
Enzymes	Protéases, amylase
Azurants optiques	Stilbènes
Colorants	
Parfums	

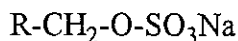
Mis à part les sels neutres qui servent de ballast, les *phosphates* sont souvent les composés en plus grande concentration dans les lessives. Par leurs propriétés complexantes, ils diminuent la dureté de l'eau en fixant le Ca et le Mg. Ainsi, ils améliorent l'efficacité des détergents. Ils se présentent souvent sous forme de tripolyphosphates qui, eux-mêmes n'ont guère de toxicité sur les êtres vivants mais deviennent "écotoxiques" par leur rôle dans l'eutrophisation.

Les produits de substitution des phosphates ne sont pas tous innocents. L'*acide citrique* voit son efficacité diminuer progressivement avec la température, on ne le retrouve donc que dans la composition des lessives basses températures. Il ne présente pas de toxicité ou d'écotoxicité démontrable et il est très rapidement dégradé (métabolite cellulaire normal entrant dans le cycle de Krebs). Le *nitrilotriacétate* (NTA) apparaît plus efficace. Les chercheurs de Procter & Gamble ont fait le point sur sa toxicité : il se dégrade rapidement dans l'environnement et sa DL50 est relativement élevée (de 100 mg/l (truite) à 10 g/l (clam)). Dans les plus mauvaises conditions (eaux froides hivernales au Canada), 70 % du NTA sont dégradés en 24 heures. En laboratoire, dans de l'eau collectée in situ, la dégradation totale (100 %) demande environ 72 heures. Aux concentrations mesurées in situ (< 0.1 mg/l) il n'a aucune toxicité aiguë. Toutefois, il a pour défaut de pouvoir relarguer par chélation les métaux lourds fixés dans les sédiments. Les *zéolithes* sont des aluminosilicates d'origine naturelle. Ils sont inertes du point de vue métabolique, donc ne subissent aucune biodégradation, ... mais ne présentent aucune toxicité. Ils s'accumulent dans les stations d'épuration et sont évacués avec les boues (dumping). L'*éthylène diamine tétra-acétate* (EDTA) agit comme le NTA. Cette molécule est très difficilement biodégradable et s'accumule dans l'environnement sous forme de sel de Ca ou de Mg. Son écotoxicité, comme celle du NTA, est liée à sa capacité de fixer et relarguer les métaux lourds.

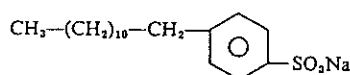
Autre composé classique des lessives, les *tensioactifs* sont responsables de l'action détersive du produit. Du simple savon à la molécule plus complexe d'alkylphényléthoxylate, toute une gamme de détergents est offerte sur le marché.

On distingue trois types de tensioactifs :

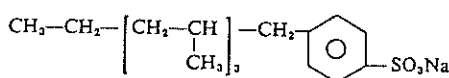
♦ les **anioniques** (les plus utilisés dans le domaine ménager) : sels d'acides gras (savons), alkylbenzène-sulfonates linéaires, sulfates d'alcool gras, ... Le domaine d'utilisation de ces détergents est celui des pH neutres et alcalins (≥ 7.0). Les détergents de synthèse ont un pouvoir mouillant supérieur, une aptitude à former des mousses et une résistance aux eaux dures supérieurs à ceux du savon.



savon

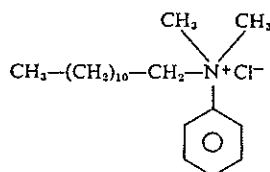
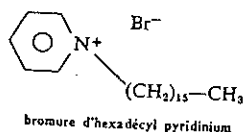


dodécylbenzène sulfonate de sodium



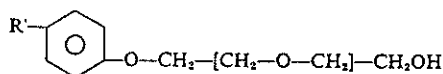
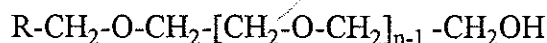
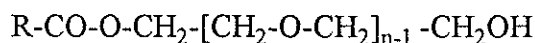
tétrapropylbenzène sulfonate de sodium

♦ les **cationiques** : sels d'ammonium quaternaire lié à une chaîne de carbone aliphatique (C_{12} à C_{18}) ou aromatique



chlorure de diméthyl, dodécyl, benzyl ammonium

♦ les **non-ioniques** : alcool-éthoxylates, alkylphénols polyéthoxylés, esters d'acides gras et de polyglycols, ...



La **biodégradabilité d'un détergent** est une notion qui prend chaque jour plus d'importance. Des très nombreuses études qui ont été consacrées à ce problème, il ressort que les chaînes hydrocarbonées linéaires sont aisément et intégralement biodégradables tandis que les chaînes ramifiées et les cycles aromatiques ne le sont que très difficilement et très partiellement (voir cycles aromatiques et hydrocarbures). Il s'ensuit que si certains détergents sont biodégradables à 100 %, d'autres résistent à peu près totalement à l'attaque des microorganismes et conservent toutes leurs propriétés superficielles et massiques quel que soit le traitement auquel sont soumises les eaux usées. Par voie de conséquence, dans de nombreux pays, la législation interdit la commercialisation de préparations contenant des détergents dont la biodégradabilité n'atteint pas une valeur limite.

La biodégradabilité des *alkylbenzènes sulfonates linéaires* (LAS, détergent anionique) a été jugée bonne, même si les avis ont divergé quelque peu sur le pourcentage de cette biodégradabilité (entre 75 et 98 %). Si on se contente de mesurer la concentration des LAS en fin de traitement dans une station d'épuration, on peut parvenir à une élimination de 98 à 99 %. Mais si on suit ces LAS au cours des différentes étapes, on constate qu'environ 25 % sont éliminés avec les solides sans être biodégradés. Ils se retrouveront donc dans les boues de la station d'épuration.

Dans le cas des *nonylphénols polyéthoxylés* (NPE, détergent non ionique), la biodégradation affecte essentiellement la partie "éthoxylate" alors que le phénol reste inaltéré. Dans ce cas, la biodégradation donne naissance à des résidus plus toxiques et très réfractaires. La toxicité aiguë du 4-nonylphénol (LC50, 24 h) est de 0.002 mg/l pour des chlorelles et 0.1 à 0.3 mg/l pour des poissons. Les concentrations mesurées dans les boues des stations d'épuration atteignent couramment 1g/kg solide. Ces tensioactifs non-ioniques constituent une famille de composés pour lesquelles les données de toxicité et de biodégradabilité devraient normalement conduire à une interdiction généralisée, alors que *les tests officiels de biodégradabilité ne tiennent compte que de la disparition du produit originel, sans tenir compte des caractéristiques des produits de dégradation.*

4.2 Biodégradation des effluents industriels

Le développement de sites industriels à proximité des côtes a entraîné des rejets industriels qui s'étendent très souvent loin en mer, bien au delà des zones de rejet. Certaines substances toxiques rejetées avec les effluents industriels n'apparaissent pas, pour le grand public, comme un problème important puisque beaucoup moins spectaculaires dans leurs effets que, par exemple les pollutions pétrolières. Elles n'en demeurent pas moins un grave problème pour l'environnement marin.

Dans les régions côtières, les rejets de sous-produits ou de déchets de l'industrie se font par l'intermédiaire d'émissaires d'eaux usées (avec les effluents domestiques), quelque fois par l'intermédiaire de barges ou de navires citernes (dumping, rejets de résidus d'incinération, ...). Les produits rejetés sont de tous ordres. Leur toxicité est variable et leurs origines peuvent être très diverses : bains électrolytiques usagés, acides divers, cyanure, solvants organiques, cétones, composés phénoliques, alcools, agents mouillants, dérivés chlorés, ...

Il y a lieu, à l'heure actuelle de considérer ces formes de rejets comme une source grave de pollution de la mer, bien que les volumes rejetés soient relativement faibles et que les agents polluants puissent être généralement neutralisés par voie chimique : un traitement est souvent possible ... il est cependant regrettable que le coût, souvent élevé, de ces neutralisations fasse souvent négliger les mesures de sécurité les plus élémentaires.

L'extension des polluants chimiques en mer est assez voisine, dans son aspect général, de celle de la pollution bactérienne dans la mesure où la *diffusion des eaux chimiquement polluées*, pour des eaux de faible densité, se fait en surface. Au contraire, certains produits lourds s'accumulent sur le sédiment et la dynamique de cette diffusion (donc les gradients de concentration) est alors différente. Dans les deux cas des modèles existent, permettant de prédire la distribution et la concentration des produits rejetés en fonction des contraintes de l'environnement. Une fois en mer, ces toxiques peuvent, ou non, être soumis à la biodégradation. Ce problème est rendu infiniment complexe par la superposition, aux phénomènes de biodégradation, de l'assimilation de ces composés par des organismes supérieurs, avec concentration et transfert aux différents noeuds du réseau trophique, détoxification, etc.

Le problème est évidemment beaucoup trop vaste pour pouvoir être abordé de manière exhaustive. Parmi l'ensemble des polluants rejetés, deux classes de composés

apparaissent particulièrement préoccupants : les métaux lourds et les composés cycliques et polycycliques, halogénés ou non. Les **métaux lourds** sortent du cadre de cet exposé. On ne peut pas vraiment parler de biodégradation à leur propos, et ils seront envisagés en détail par ailleurs (Voir cours de J.M. Bouquegneau). L'importance écologique et l'omniprésence des **cycles aromatiques** nous ont conduit à choisir cet exemple pour la suite de ce chapitre. Ils ont, par ailleurs, déjà été envisagés en détail du point de vue écotoxicologique (voir cours de J.P. Thomé). Nous étudierons ici les modalités de leur biodégradation en milieu marin, en les resituant dans le cadre général du métabolisme "normal" et des adaptations des microorganismes responsables de cette biodégradation.

4.2.1 Les composés cycliques et polycycliques

Les composés aromatiques cycliques et polycycliques sont largement utilisés dans la pratique courante et leurs dérivés font partie de notre quotidien. Intermédiaires obligés de nombreuses réactions en chimie organique industrielle, ils figurent aux places de choix du catalogue des polluants organiques des effluents domestiques, industriels et des décharges.

Toutefois, le problème se présente un peu différemment dans ce cas, si on les compare aux nombreux autres types de molécules artificiellement synthétisées ces quelques dernières dizaines d'années. En effet, la capacité à métaboliser ces composés aromatiques et à les utiliser comme seule source de carbone et d'énergie existe chez un grand nombre de souches bactériennes et de champignons. Certaines souches sont plus versatiles que d'autres, mieux équipées, quant à l'arsenal enzymatique et aux voies métaboliques à leur disposition. Pour pouvoir croître sur de tels composés, une souche bactérienne doit être capable de dégrader au moins certaines parties des molécules aromatiques jusqu'au stade de composés carbonés simples, composés intermédiaires dans le métabolisme cellulaire (CO_2 , acétate, pyruvate, ...), anabolique (assimilatif) ou énergétique (dissimilatif). L'essentiel de ces phénomènes de biodégradation des composés aromatiques (du moins les mieux étudiés) s'effectue en aérobiose, nécessitant de l'oxygène moléculaire et des mono- ou dioxygénases à différents niveaux des voies métaboliques de transformation des cycles.

De manière générale, l'étape-clé de ce processus est l'ouverture du cycle aromatique, générant un composé aliphatique. Ceci s'effectue le plus souvent par l'insertion d'oxygène sur le cycle par l'intermédiaire de **mono- ou dioxygénases**. Ces enzymes fixent un ou deux hydroxyles en ortho ou para "activant" le cycle. Il s'agit de flavoprotéines ayant une action de type allostérique permettant un excellent contrôle de l'activité enzymatique.

Certaines molécules servent d'intermédiaires métaboliques et se retrouvent au carrefour des principales voies de dégradation de presque tous les composés aromatiques. Il s'agit du catéchol (1,2-dihydroxybenzène), de l'acide protocatéchique (acide 3,4-dihydroxybenzoïque) et de l'acide gentisique (acide 2,5-hydroxybenzoïque).

La dégradation s'effectue en trois étapes :

- **préparation du cycle à son ouverture** : fixation des -O sous forme d'hydroxyles et élimination éventuelle des chaînes aliphatiques latérales
- **ouverture du cycle**
- **transformation du composé aliphatique formé en métabolites.**

En présence de molécules polycycliques, le mécanisme se renouvelle jusqu'à épuisement des cycles aromatiques (v. fig. 4.11 et 4.14).

En **conditions anaérobiques**, le mécanisme d'hydroxylation des cycles aromatiques préalablement à la fission reste possible par l'intermédiaire d'**hydroxylases** relativement peu spécifiques (agissant souvent comme des déshydrogénases). Ces réactions anaérobiques sont nettement moins bien connues que leurs équivalents en conditions aérobiques.

On peut prendre l'exemple de la 4-hydroxyacétophénone, dont le catabolisme a été bien étudié et peut faire l'objet de variantes suivant les microorganismes impliqués.

Deux voies principales ont été décrites (Fig. 4.6).

□ La voie utilisée par *Pseudomonas* (A) est caractéristique du traitement des cétones aromatiques. L'oxygène est introduit entre le carbone de la chaîne latérale porteur du radical cétone et son voisin sur le cycle, générant un ester. L'enzyme catalysant la réaction est une monooxygénase (n'agissant pas comme une hydroxylase) utilisant le NADPH comme cofacteur. Le 4-hydroxyphényl-acétate ainsi formé est ensuite hydrolysé en hydroquinone et acide acétique. L'hydroquinone, avec ses deux radicaux hydroxyles en para, est le substrat de clivage du cycle. Cette molécule est transformée en 3-oxoadipate, molécule aliphatique aisée à dégrader en pyruvate, succinate, acétyl-CoA, ... intégrées au cycle de Krebs.

□ La voie utilisée par *Alcaligenes* (B) est différente bien qu'elle mette en jeu des oxygénases. Dans ce cas, une monooxygénase provoque l'hydroxylation du groupe méthyle en présence d'oxygène moléculaire et de NADH. Lors de l'étape suivante, une dioxygénase provoque alors la rupture de la chaîne latérale en acide formique et acide 4-hydroxybenzoïque. Cette dernière molécule est alors hydroxylée (monooxygénase) en acide protocatéchuique, qui sera le substrat de fission du cycle (fission en ortho ou en méta suivant les souches).

Un autre exemple est donné à la figure 4.18, dont l'intermédiaire de fission est le catéchol.

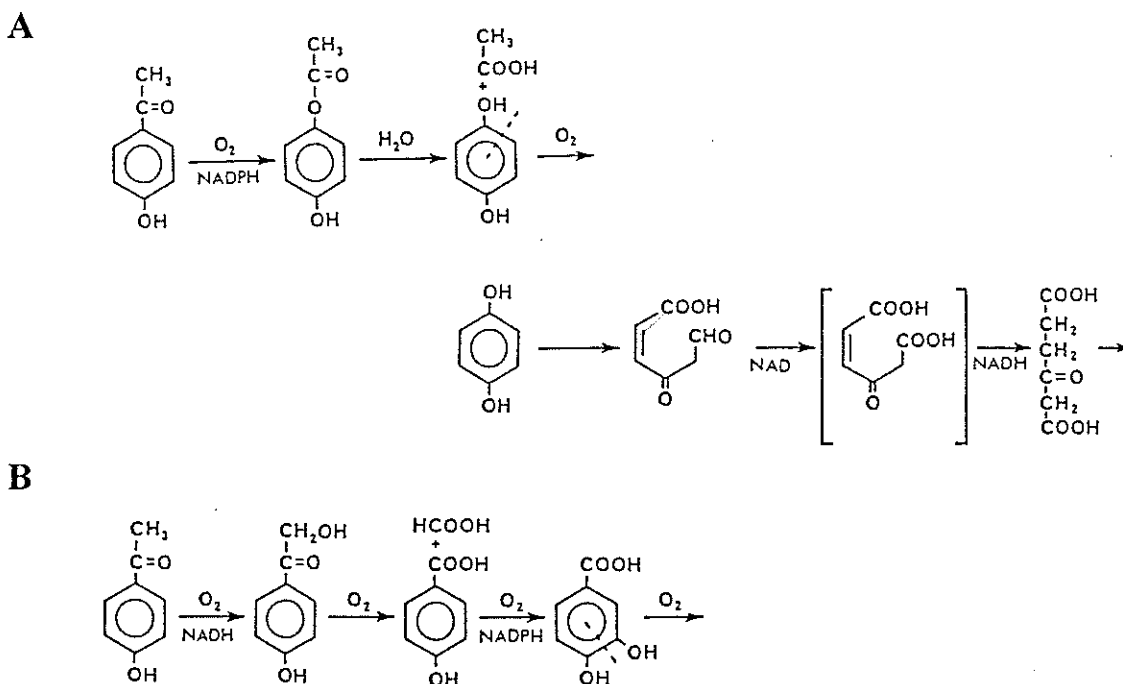


Fig.4.6 Dégradation de la 4-hydroxyacétophénone par *Pseudomonas* (A) et *Alcaligenes* (B)

La relative abondance des souches susceptibles de dégrader ce type de composés artificiels peut s'expliquer par la *similitude de structure de ces molécules avec des*

molécules naturelles abondantes, pour lesquels des mécanismes enzymatiques de transformation ou de biodégradation existent, les hormones stéroïdiennes, les acides biliaires ou, beaucoup plus abondante, la *lignine*. Il s'agit d'un polymère de type phénylpropanoïde (assemblage d'unités de type cycle aromatique en C6 sur lequel est branchée une chaîne en C3 : coniférol, alcools coumarique et sinapique, ...), avec une masse moléculaire atteignant 10^5 daltons. Sa structure n'est pas uniforme (fig. 4.7), mais apparaît plutôt composée d'une grande variété de composés, aromatiques ou non, dont la masse moléculaire oscille autour d'une valeur moyenne, agencés de manière tridimensionnelle sans ordre apparent et sans maille répétitive.

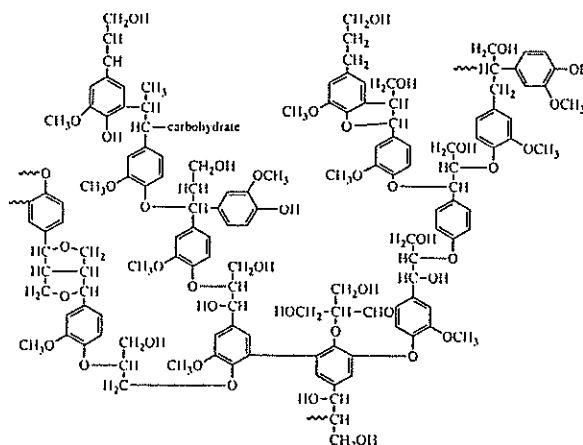


Fig. 4.7 Structure partielle d'une molécule de lignine

De manière générale, les liaisons entre "monomères" sont de type C-C ou d'autres liaisons relativement inertes. En association avec la cellulose, la lignine est probablement le polymère le plus largement répandu dans la biosphère (biomasse $> 3 \cdot 10^{11}$ tonnes, avec une production annuelle de l'ordre de $2 \text{ à } 5 \cdot 10^9$ tonnes).

En raison de sa grande abondance, il n'est nullement surprenant que des mécanismes divers de dégradation de "cette molécule" aient été élaborés par les microorganismes décomposeurs de tous milieux (bactéries, actinomycètes, fungi, ...).

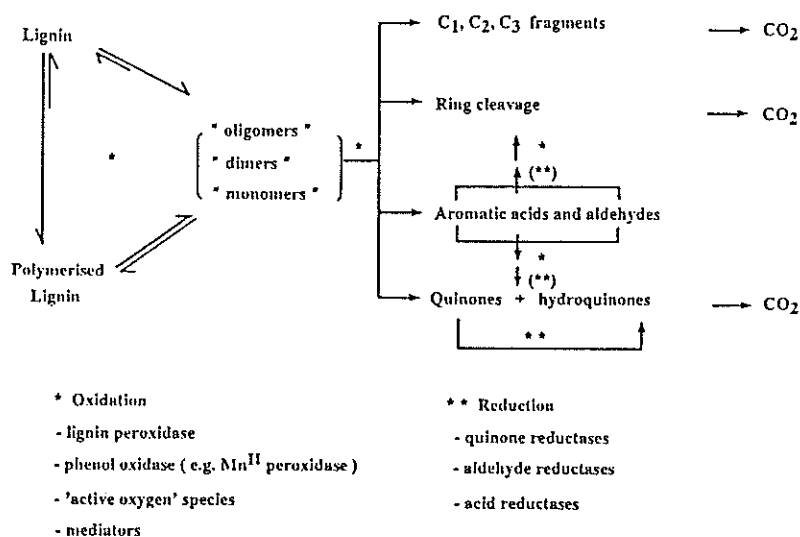


Fig. 4.8 Catabolisme de la lignine

En 1983, on a isolé une "*ligninase*". D'abord considérée comme une oxygénase, elle a ensuite été identifiée comme une peroxydase H_2O_2 dépendante susceptible d'oxyder les composés non phénoliques par un transfert d'électrons provoquant la formation d'un radical cationique hautement réactif. La faible spécificité de cette réaction est largement utilisée dans les préliminaires à la dégradation des xénobiotiques. En association avec cette lignine-peroxydase, d'autres oxydases ont été mises en évidence : laccase (peroxydase dégradant les composés phénoliques), peroxydase Mn dépendante, phénol oxydase, ... préparant à l'ouverture des cycles aromatiques selon les modalités vues précédemment (fig. 4.6).

On a observé que les microorganismes capables de dégrader la lignine étaient aussi souvent capables de dégrader de nombreux xénobiotiques réputés rémanents : DDT et ses métabolites, PCBs, Dioxine, chlorophénols, ... voire même le TNT. Bien que les voies cataboliques ne soient pas encore totalement élucidées, on considère que les complexes enzymatiques ligninolytiques sont déterminants dans ce métabolisme. La lignine-peroxydase serait ainsi capable de déchlorination des cycles polychlorés (voir paragraphe suivant). Dans le cas du pyrène (Fig. 4.9), la formation du radical est suivie de l'hydroxylation du cycle. La molécule peut dès lors subir les étapes conduisant à l'ouverture du cycle précédemment décrites. Toutefois, une autre voie conduit à la formation de pyrène 1,6-dione, un puissant mutagène issu du pyrène relativement inoffensif.

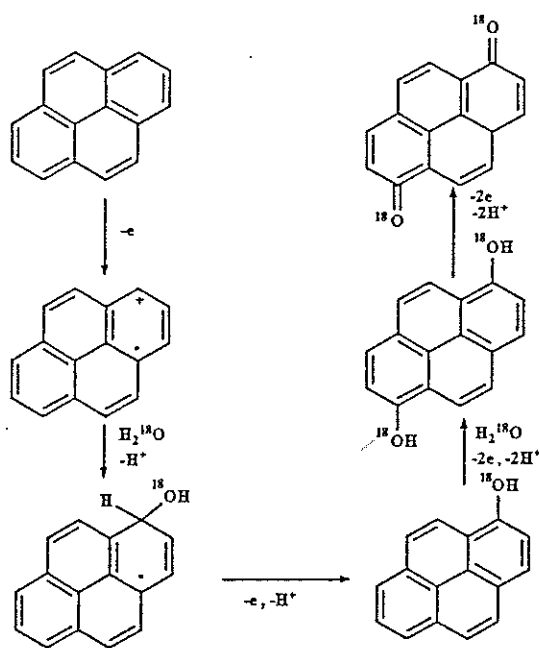


Fig. 4.9 Dégradation du pyrène en pyrène 1,6-dione sous l'effet des complexes enzymatiques de dégradation de la lignine

Dans le cas des cycles polychlorés (voir ci-dessous), les quantités très importantes de ces composés déversées dans l'environnement depuis le début du siècle ont certainement eu un effet sélectif intense sur les microorganismes, favorisant les souches capables de détoxiquer et/ou de métaboliser ces composés rapidement et efficacement.

4.2.2 Les cycles polychlorés (pesticides et PCBs)

Remarque

Cette matière fait l'objet d'un cours de J.P. Thomé en 2^{ème} LZ, où une partie des données ci-après ont été empruntées. On consultera ce cours pour de plus amples informations sur ce problème des micropolluants, de l'écologie et l'écotoxicologie des organohalogénés. Nous nous bornerons, ici, au problème de la dégradation des cycles polychlorés en milieu marin, envisagé comme exemple de composés typiques des effluents industriels.

Les **PCBs (polychlorobiphényles)** constituent une catégorie de composés aromatiques chlorés qui ont trouvé de très nombreuses applications à cause de leur stabilité, de leur inertie et de leurs extraordinaires propriétés diélectriques. Ils ont été largement utilisés dans l'industrie plastique (élastomères, adhésifs, ... voir plus loin) et électrique (transformateurs, condensateurs). "**Pesticide**" est le terme général utilisé pour désigner l'ensemble des composés chimiques visant à détruire les "pestes" en agriculture (insecticides, herbicides, fongicides, ...). Parmi tous ces produits, un groupe d'insecticides organiques de synthèse mérite une attention particulière, ceux appartenant au groupe des hydrocarbures polychlorés. Comme les PCBs et certains herbicides (2,4-D ou 2,4,5-T), ils sont extrêmement persistants dans l'environnement, contrairement à la majorité des autres biocides qui sont l'objet d'une biodégradation relativement rapide et efficace.

Les travaux de Joiris, Thomé et coll. ont, depuis longtemps, montré l'importance de la contamination de l'écosystème mer du Nord par les cycles aromatiques chlorés. A titre d'exemple, la Fig. 4.10 illustre les stocks et transferts de et vers la mer du Nord dans le cas des polychlorobiphényles.

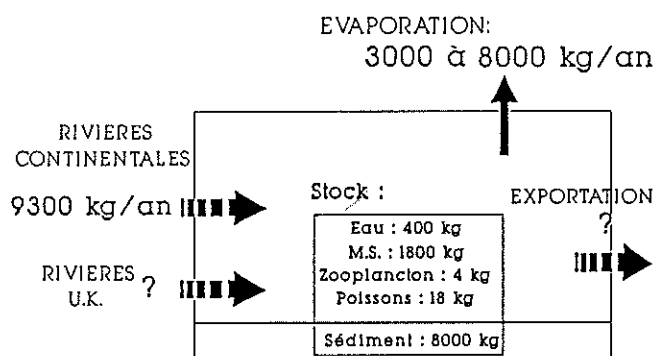


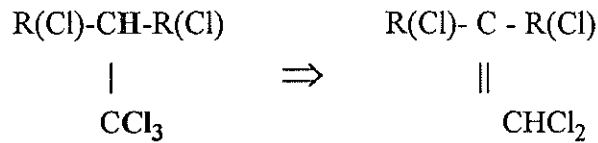
Fig. 4.10 Estimation des stocks et flux de PCBs de et vers la baie sud de la mer du Nord

Différentes voies de dégradation existent (dégradation photochimique, redox, par hydrolyse) envisagées dans le cours d'écotoxicologie. Nous nous limiterons ici à la biodégradation des cycles polychlorés en milieu marin.

Les réactions mises en jeu, préalablement à l'ouverture des cycles, consistent en élimination des halogènes.

Les principales voies microbiennes sont :

- ♦ la *déhydrochlorination* au cours de laquelle un atome de Cl et un H du C adjacent sont enlevés de la molécule initiale.



- ♦ la *déchloration réductrice* (un H remplace le Cl enlevé)
- ♦ *réactions d'oxydation* (généralement époxydation d'une double liaison)

Ainsi, dans le cas du DDT, la dégradation de cette molécule par les *Klebsiella* en milieu estuarien peut se concevoir comme suit (Fig. 4.11) :

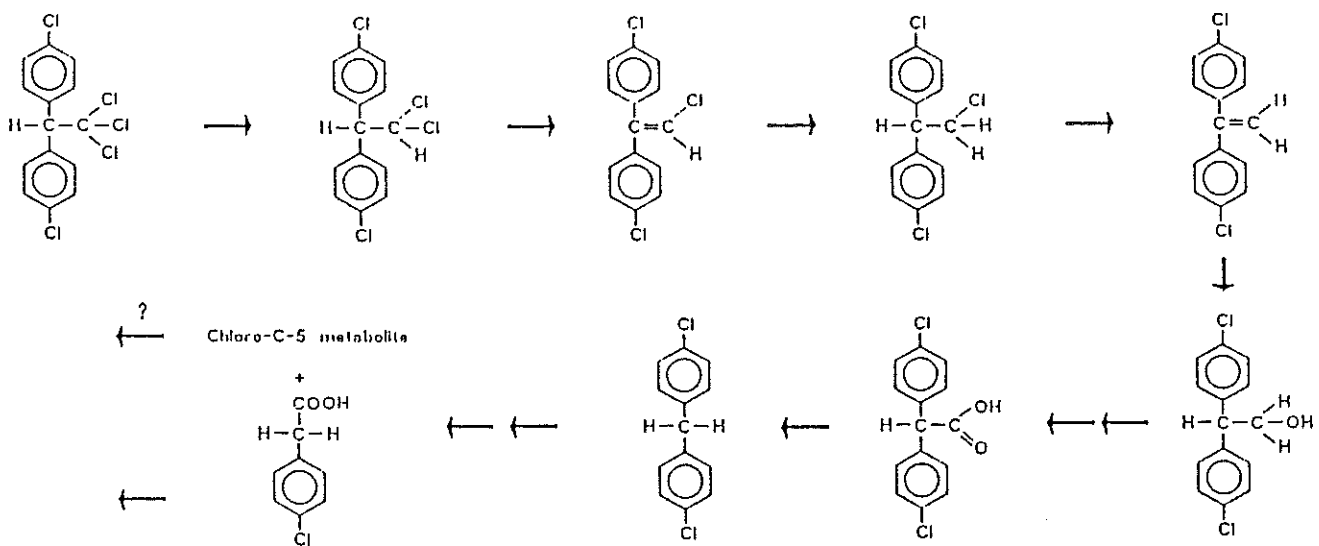


Fig. 4.11 Biodégradation du DDT en milieu estuarien par *Klebsiella aerogenes*

Cette voie métabolique de *dégradation du DDT* fait intervenir alternativement des réactions de déchloration réductrice et de déhydrochlorination générant divers métabolites intermédiaires (DDE, DDMU, DDD, DDMS, ...). Ces molécules peuvent être dégradées plus avant jusqu'à la rupture oxydative de la molécule, préalable à l'ouverture des cycles (selon les modalités vues précédemment). Ces molécules intermédiaires peuvent également être générées par photo oxydation, et ensuite, métabolisées par les microorganismes. Par ailleurs, et contrairement à ce qui est souvent admis, si cette biodégradation n'arrive pas à son terme, les produits de la dégradation peuvent être aussi, voire plus toxiques que la molécule originelle. C'est le cas ici du DDD et du DDE par exemple. Contrairement au cas des halides aromatiques, la liaison C-Cl des aryl-halides ne peut être hydrolysée par déplacement nucléophile. L'élimination des radicaux Cl des cycles aromatiques ne s'effectue donc, le plus souvent, qu'après ouverture du cycle générant un composé chloré aliphatique.

Dans le cas des *PCBs*, la voie métabolique la plus importante pour la dégradation est l'hydroxylation. La capacité que possèdent les bactéries de dégrader ces molécules dépend du degré de chloration et de la position des Cl substitués, de la stéréochimie et de la structure électronique du biphenyle. Les biphenyles mono- et dichlorés sont en

général plus facilement et plus rapidement dégradés que les molécules comportant un plus grand pourcentage de chlore, d'autant plus que l'encombrement stérique des molécules a une influence sur la vitesse de dégradation des PCBs.

La prolifération des souches susceptibles de dégrader les PCBs s'observe en réponse à une contamination chronique. Sept genres de bactéries "PCB-clastes" ont pu être isolées des milieux estuariens (*Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Bacillus* et *Streptomyces*) tandis que seules les *Pseudomonas* et *Vibrio* se retrouvent en milieu océanique s.s. (tant en pleine eau que dans les sédiments).

La biodégradation des PCBs a été étudiée en culture pure (Fig. 4.12). On a pu montrer la disparition progressive de la contamination du milieu (Aroclor 1248) sous l'action des populations naturelles (estuariennes) enrichies en *Pseudomonas aeruginosa* au début de l'expérience. Dans ce cas, les PCBs ne sont pas la seule source de C.

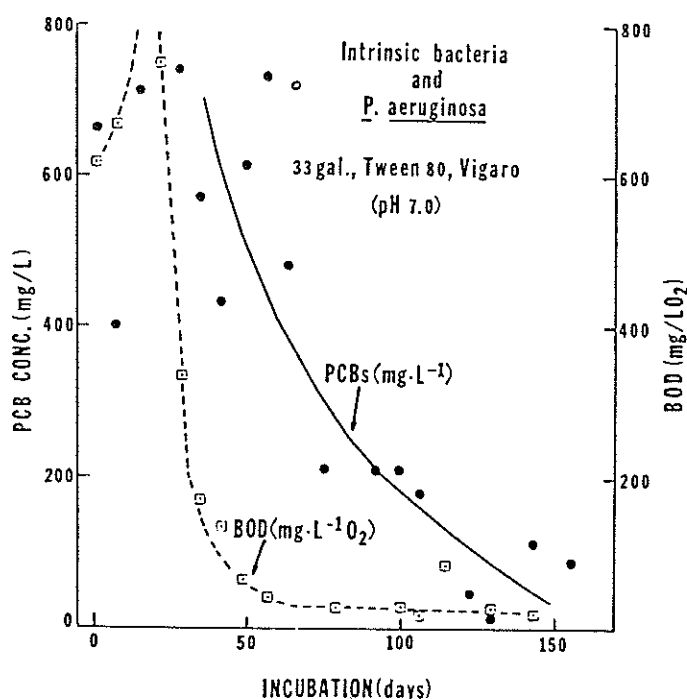


Fig. 4.12 Biodégradation d'Aroclor 1248 en fonction du temps par une culture bactérienne mixte à 37°C en bioréacteur

Les produits de dégradation peuvent varier suivant les espèces de bactéries : certaines convertissent les PCBs en acide chlorobenzoïque. D'autres souches peuvent même produire du phénylpyruvate comme principal métabolite. Rappelons ici encore que certains produits, comme la Dioxine, issus de la dégradation (sous médiation biologique ou non) de ces cycles chlorés peuvent être beaucoup plus toxiques que les molécules originelles (PCBs, LD₅₀ : 1000 mg/kg ; PCDF et PCDD, LD₅₀ : 0.6-50 mg/kg). De manière générale, la dégradation bactérienne va plus loin que la dégradation métabolique chez les organismes supérieurs (ouverture des cycles). Toutefois, les performances de cette dégradation microbienne diminuent avec l'encombrement des molécules, l'Aroclor 1221 (21 % de Cl) est métabolisé plus rapidement (980 µg/mg cellules bact./heure) que l'Aroclor 1254 (54 % de Cl, 43 µg/mg cell/h).

Suivant leur degré de chloration et leur concentration, les PCBs peuvent stimuler ou, au contraire, inhiber la croissance de certaines souches des populations naturelles mixtes et entraîner ainsi de profondes modifications dans la composition des micro biocénoses. Sur

85 souches isolées du milieu estuarien, 26 ont vu leur croissance sévèrement inhibée par 0.5 mg/l d'Aroclor tandis que d'autre voyaient changer leur morphologie. L'effet des PCBs se porte essentiellement sur l'uptake des bases de l'ADN et leur incorporation, alors que la respiration et la synthèse protéiques paraissent non affectées. Les PCBs les moins chlorés apparaissent plus mutagènes que les plus chlorés. Les souches les plus sensibles (au seuil de 10 µg/l) sont représentatives des genres *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus* et *Serratia*. L'effet de l'Aroclor 1254 est toutefois réversible après 18 heures d'exposition à des teneurs inhibant la croissance. Cette inhibition des bactéries hétérotrophes, parmi les plus abondantes, pourrait avoir une importance prépondérante dans le turnover des molécules organiques et les cycles du N et du C en milieu estuarien, ces souches étant essentiellement amylolytiques et protéolytiques.

A l'inverse, certaines souches (*Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*) croissent en présence de PCBs jusqu'à des concentrations de 200 µg/ml. Dix souches ont été cultivées avec les PCBs comme seule source de carbone, et on a mesuré une croissance du nombre de colonies (CFU) concomitante de la disparition du substrat. Les courbes de croissance de ces souches étaient seulement très légèrement plus basses comparées aux cultures en milieu "riche" (Fig. 4.13).

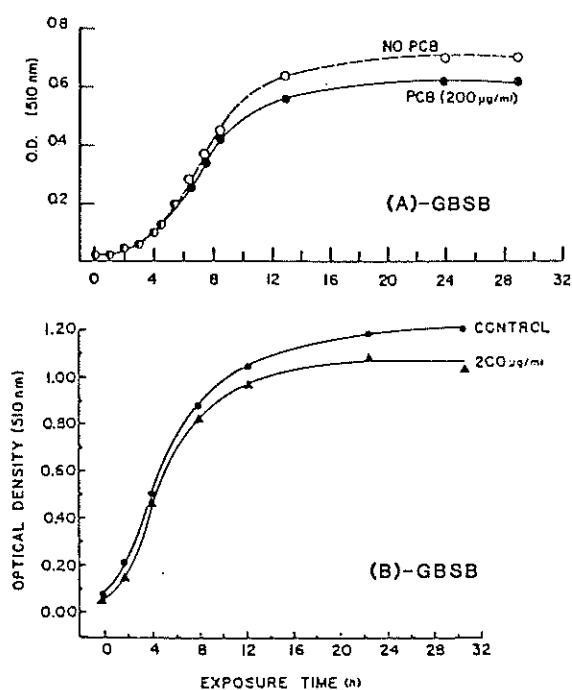


Fig. 4.13 : Effets de l'Aroclor 1254 sur la croissance à 37°C de (A) *Serratia liquefaciens* et (B) *Pseudomonas aeruginosa*

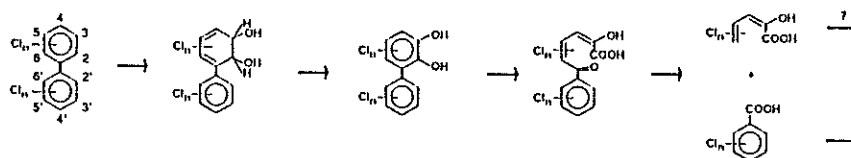


Fig. 4.14 Voie métabolique de dégradation des PCBs par *Achromobacter* ou *Serratia*.

Les souches "PCB-clastes" sont en général des bacilles gram⁻ strictement aérobiques et mobiles.

Les PCBs apparaissent dégradés selon les mêmes modalités que les biphényles : oxygénation du cycle aboutissant à un cis-hydrodiol, deux radicaux -OH étant fixés sur des sites non chlorés. Cette molécule subit alors une déshydrogénation réductrice pour former un composé 2,3-dihydroxy qui subit alors un clivage du cycle entre les deux -OH. Par la suite, la chaîne aliphatique chlorée est hydrolysée, laissant un radical d'acide chlorobenzoïque qui pourra, lui-même être dégradé par les voies déjà décrites de dégradation des composés aromatiques.

De nombreuses souches sont capables d'utiliser les PCBs dans leur métabolisme sans pour autant en tirer de l'énergie à condition qu'un autre substrat métabolisable soit fourni. Ce phénomène s'appelle "*cométabolisme*". Le cométabolisme des PCBs en présence d'acétate a montré une meilleure dégradation des isomères les plus chlorés, généralement très réfractaires.

Levures et fungi se montrent très sensibles à la contamination par les PCBs, bien que les isomères les plus chlorés puissent stimuler la croissance de certaines levures. En interagissant avec le système transporteur d'électrons au niveau des cytochromes, les PCBs forcent ces microorganismes à utiliser leurs voies fermentatives d'acquisition d'énergie, même en présence d'oxygène, ce qui retentit sur leurs capacités de croissance. Leurs capacités de biodégradation de ces molécules est inconnue, à l'heure actuelle, en milieu marin.

4.3 Biodégradation des hydrocarbures

Il n'est plus nécessaire de présenter la pollution par les hydrocarbures et ses effets immédiats. Ces mots évoquent instantanément une série de clichés, hélas encore trop souvent à l'actualité : des vagues lourdes, noires, visqueuses qui, quelques heures après un échouage déposent leur charge polluante sur les côtes, des oiseaux englués qui s'enlisent et qui meurent et, moins grave mais si fréquent, ce sable qui, chaque été nous noircit généreusement les pieds et qui nous rappelle que, même en l'absence d'accidents spectaculaires, les rejets d'hydrocarbures sont quotidiens.

Tableau 4.2 Estimation des rejets pétroliers en mer du Nord
(période 1980-1986, en millier de tonnes par an)

Décharge des fleuves, ruissellement	40 - 80
Echouages de pétroliers	5 - 15
Raffineries côtières	6 - 11
Effluents directs des villes côtières	3 - 14
Immersion des effluents au large	5 - ?
Dégazages en mer	3 - ?
Production au niveau des plates-formes offshore	2 - 23
Apports atmosphériques	10 - 20
Suintements naturels	0.1 - 1
Terminaux pétroliers côtiers	0.6 - 0.8
Autres effluents industriels côtiers	9 - ?
Total	95 - 165

En effet, en dépit des fluctuations de son prix, le pétrole est et restera, pendant quelques décennies encore, la source principale d'énergie pour l'homme. Par voie de conséquence,

il est aussi une cause importante de pollution. D'après un rapport de la National Academy of Sciences (1985), *plus de 6000 millions de tonnes sont rejetées annuellement dans les océans*. Il est intéressant de constater que l'apport massif, à la suite d'accidents (échouages de navires et fuites au niveau de plates-formes de forage essentiellement), ne représente que 4 % de la quantité totale déversée. La mer du Nord, bordée de pays à haute densité de population et fortement industrialisés, est une cible majeure pour ce type de pollution (Tableau 4.2)

Malgré tout, ce type de catastrophe écologique a entraîné l'intensification des recherches, aussi bien dans le domaine fondamental (métabolisation des hydrocarbures par les micro-organismes, techniques d'analyse, ...) que dans le domaine appliqué (développement de technologies de lutte contre les pollutions).

Les *principaux effets* qui vont intervenir dans la *disparition du pétrole* rejeté accidentellement en mer sont illustrés par la figure 4.15 . Au contact de l'eau, le pétrole a tendance à s'étaler. Il est ensuite soumis à l'effet de facteurs abiotiques (évaporation, dissolution, dispersion-émulsion, photo-oxydation, sédimentation, ...) et biotiques (biodégradation). Ces derniers nous intéresseront le plus dans la suite de ce chapitre. La complexité du problème du devenir des nappes pétrolières est accrue par la composition chimique du pétrole qui est constitué de plusieurs centaines de composés, dont un très grand nombre est encore inconnu. Une difficulté majeure pour apprécier l'évolution d'une pollution par le pétrole est donc liée aux techniques d'analyse, d'autant plus que la composition d'un "brut" varie énormément en fonction de son origine (v. tableau 4.3).

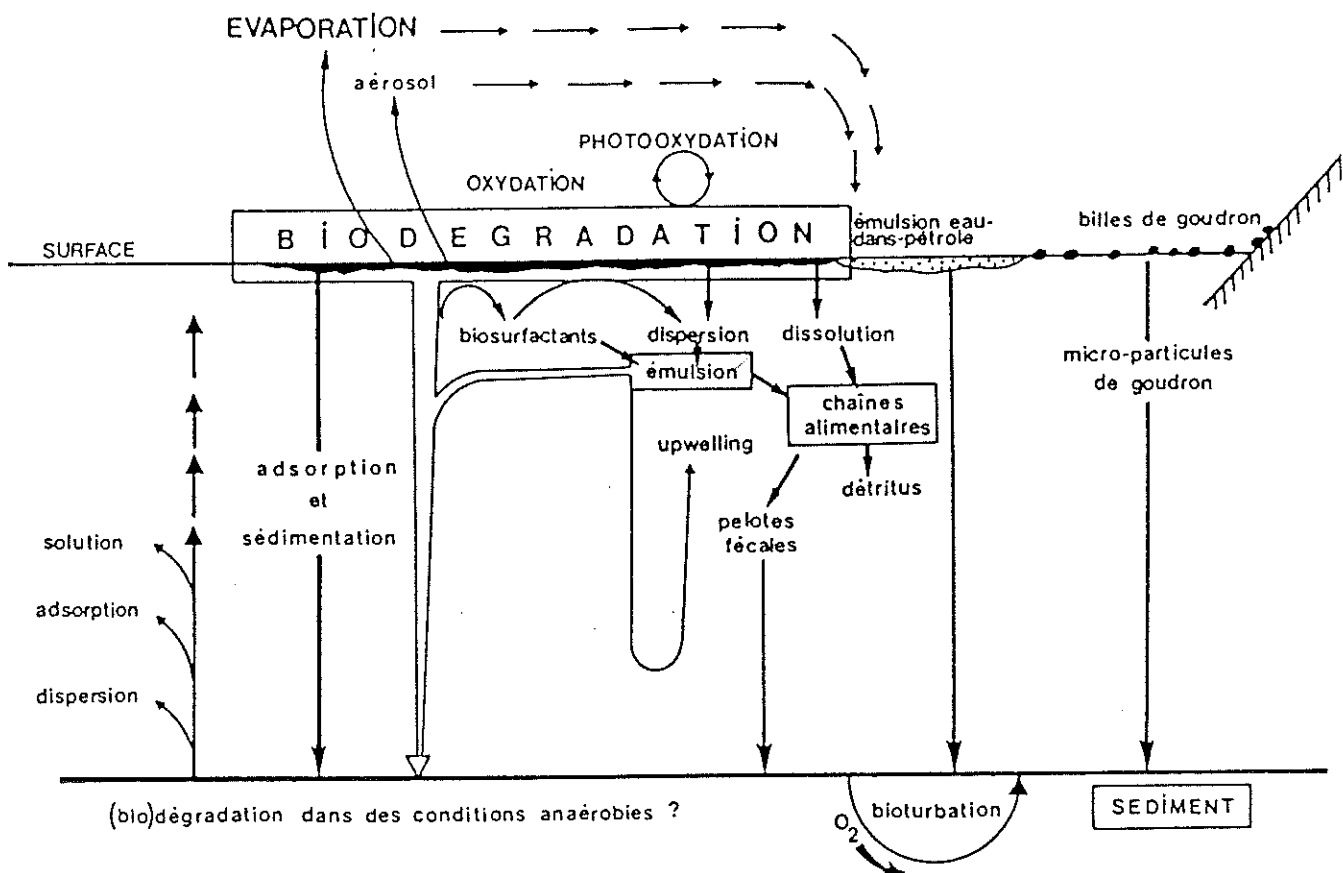


Fig. 4.15 Processus physicochimiques et biologiques intervenant dans l'évolution d'une nappe de pétrole en milieu marin. [D'après Bertrand & Mille, 1989]

4.3.1 Composition des hydrocarbures pétroliers exploités industriellement

Les pétroles bruts sont formés de plusieurs familles de composés (Fig. 4.16). Les deux principaux sont les hydrocarbures saturés (n-alcane, alcanes ramifiés et cyclo-alcanes) et les hydrocarbures aromatiques, dont le nombre de noyaux varie généralement de 1 à 6. A côté de ces deux familles qui représentent normalement plus de 50 à 90 % d'un brut, on trouve d'autres classes de composés : dérivés non hydrocarbonés (N, S, O), fraction asphaltique (asphaltènes et résines), porphyrines, ...

Les proportions entre ces différentes classes de composés varient beaucoup avec l'origine du pétrole (tableau 4.3). Ces différences de composition justifient l'observation que les caractéristiques physicochimiques des pétroles varient beaucoup. Ces caractéristiques (masse volumique, teneur en soufre, viscosité, ...v. tableau 4.4) conditionneront son devenir en cas de pollution accidentelle.

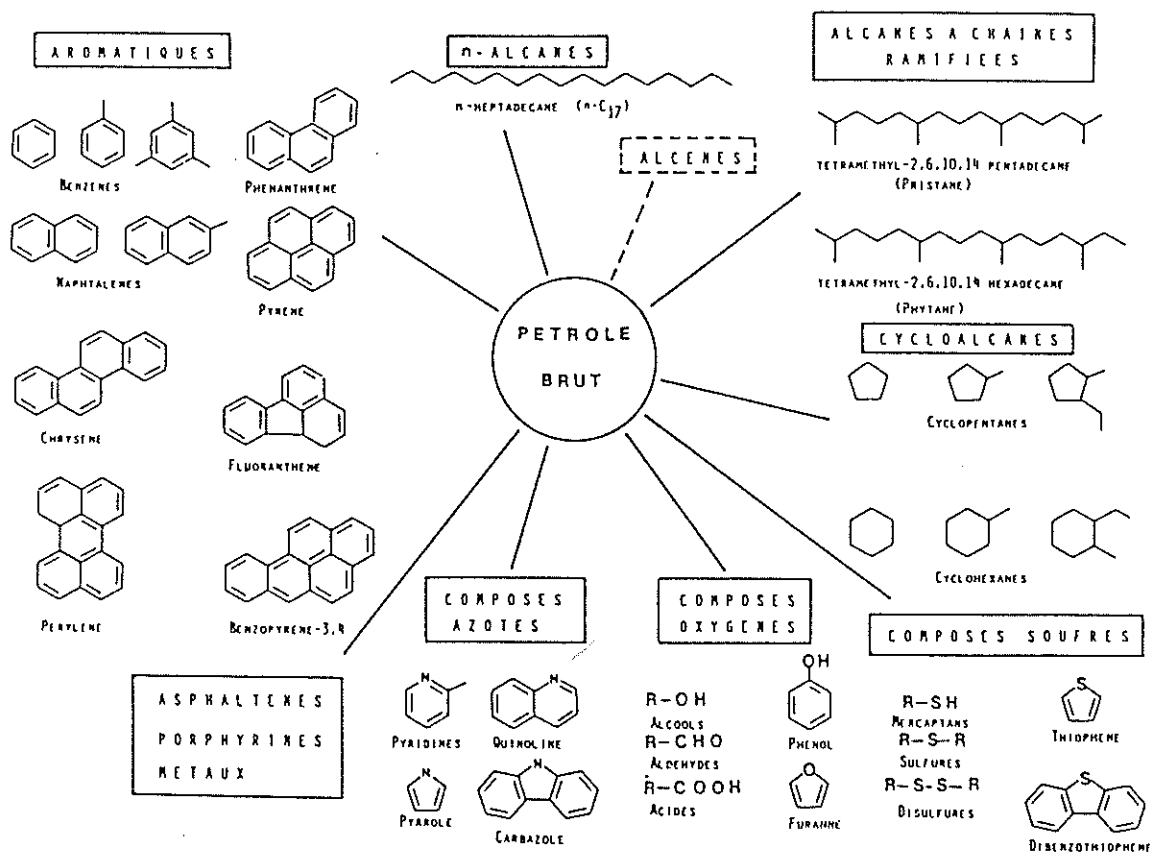


Fig. 4.16 : Composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans les pétroles bruts.

Tableau 4.3 : Proportions des différentes familles d'hydrocarbures dans divers "bruts" pétroliers

Bruts pétroliers (origine)	Saturés	Aromatiques	Polaires (Résines)	Asphaltènes
"Sud Louisiane"	69	20	10.3	0.3
"Koweït"	44	28.3	23.2	4.5
"Bunker C"	21.1	34.2	30.3	14.4
"Léger d'Arabie"	48	35	9	7.5
"Ashtart tunisien"	48	32	12	8
"Venezuela"	46	21.6	19.3	9

□ Hydrocarbures saturés

♦ *Alcanes linéaires (n-alcanes)* : composés de formule générale C_nH_{2n+2} . Le nombre de C varie de 5 (n-pentane) jusqu'à 60 (n-hexacontane). Les chaînes à nombre de C pair et impair sont sensiblement en proportions égales. Ils représentent, en moyenne, entre 10 et 40 % d'un brut.

♦ *Alcanes ramifiés* : ils regroupent les iso-alcanes (groupe méthyle en position 2, les plus abondants), les anteisoalcanes (ramifiés en position 3, beaucoup moins nombreux) et les isoprénoides (ramifications multiples). On les trouve dans les mêmes proportions que les n-alcanes.

♦ *Cyclo-alcanes (naphènes)* : famille complexe de composés cycliques dérivés du pentane ou de l'hexane, parfois polycycliques, le plus souvent substitués. Ils peuvent représenter 30 à 50 % d'un brut.

□ Hydrocarbures aromatiques

Ils constituent un mélange de nombreux composés tels les benzènes mono- et polyalkylés, les naphthalènes et les polyaromatiques (2 à 6 noyaux, anthracène, phénanthrène, benzopyrène) diversement substitués. En général, ils sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30 % des hydrocarbures pétroliers.

□ Composés non hydrocarbonés (N, S, O)

Ce sont, en général, des constituants mineurs d'un pétrole brut, à l'exception des pétroles très lourds. Les dérivés soufrés (aryl- et alkylmercaptans et thiophènes) sont souvent plus abondants que les composés oxygénés (phénols, acides gras, ...) ou azotés (pyridine, quinoléine, carbazole, ...). La teneur en S (de 0.05 à 5 % en masse) est une caractéristique importante pour la détermination des propriétés d'un brut.

□ Fraction asphaltique

Elle peut représenter 5 à 20 % d'un brut et englobe les asphaltènes (composés insolubles dans l'hexane) et les "résines" (structuellement très mal connues du fait de la complexité de leur analyse).

□ Porphyrines

Presque exclusivement sous forme de complexes de vanadium et de nickel, elles proviennent de la dégradation des chlorophylles. Elles attestent l'origine biologique des pétroles. Leur teneur varie entre 1 et 3500 mg/l.

Tableau 4.4 : Caractéristiques analytiques de quelques pétroles bruts

Caractéristiques	Irak	Koweït	Edjelé (Sahara)	Hassi Messaoud	Nigeria	Gabon	Venezuela Maracaïbo
Masse volum.	847	867	815	808	888	867	963-983
Degré API	35.5	31.6	42.0	43.5	27.7	31.6	12.3-15.2
Teneur en S	2.2	2.6	0.06	0.2	0.3	0.8	2.3-2.8
Viscosité	7.6	18	5.5	3.5	16	28.3	-

La masse volumique est exprimée en kg/m^3 ; la teneur en soufre en % de la masse et la viscosité en centistokes à 20°C.

Les degrés API permettent la classification en bruts "légers" (> 30) et lourds (< 30). Ils se calculent à partir de la masse volumique.

4.3.2 Dégradation et dispersion des hydrocarbures

Du fait de la très faible solubilité des hydrocarbures dans l'eau et de leur densité en moyenne légèrement inférieure à l'unité, les hydrocarbures relâchés dans le milieu marin forment très souvent une nappe d'huile, dont le comportement et le déplacement seront directement liés aux courants, aux vagues, aux vents, ainsi qu'à sa nature même. Une fois formée, la nappe d'hydrocarbures sera soumise à différents facteurs abiotiques et biologiques, dont l'action conjointe ou décalée dans le temps, sera responsable de sa disparition plus ou moins rapide et de son vieillissement. Les principaux facteurs abiotiques sont :

□ *Evaporation*

Ce phénomène dépend des températures respectives de l'eau et de l'air, de l'agitation de la houle, de l'épaisseur et de la nature du film d'huile. Elle commence dès que les hydrocarbures sont répandus à la surface de l'eau. Les hydrocarbures les plus légers ($< C_{15}$, 20 à 50 % de la plupart des fuels) sont éliminés par cette voie dès les premiers jours. D'autres hydrocarbures (C_{15} à C_{25}) peuvent également s'évaporer, mais beaucoup plus lentement.

□ *Dissolution*

La solubilité des hydrocarbures dans l'eau de mer est très faible. En règle générale, un hydrocarbure est d'autant plus soluble dans l'eau que sa masse moléculaire est faible et que sa polarité est élevée (benzène 1800 mg/l, toluène 515, naphtalène 32, phénanthrène 1, chrysène 0.002). La tension de vapeur et la solubilité d'un hydrocarbure contrôlent l'importance relative des phénomènes d'évaporation et de dissolution. Dans la plupart des cas, l'évaporation l'emporte nettement mais il peut arriver, en présence de surfactants naturels comme les biosurfactants (relargués par les algues benthiques et le phytoplancton notamment) ou les acides humiques, que le phénomène de dissolution devienne significatif. En cas de mer agitée, l'émulsion du pétrole dans l'eau peut contribuer à disperser une part très importante de la nappe polluante.

□ *Photo-oxydation*

L'exposition des hydrocarbures pétroliers à l'oxygène et aux radiations solaires dans les eaux de surface peut conduire à leur transformation par photo-oxydation. L'efficacité de ce phénomène dépend de l'intensité, la nature (spectre de longueurs d'ondes) et la durée de l'exposition, de la nature des hydrocarbures et de la présence de composés non hydrocarbonés. Les radiations solaires peuvent agir directement, ou par l'intermédiaire de molécules-relais appelées photosensibilisateurs. Les composés aromatiques sont dégradés plus rapidement que les aliphatiques, et parmi ces derniers, les composés ramifiés sont plus facilement transformés que les n-alcanes. Certains organométalliques présents dans

les pétroles accélèrent l'oxydation des hydrocarbures (catalyseurs) contrairement aux composés soufrés qui la ralentissent.

De nombreux produits oxygénés tels des acides carboxyliques, des alcools, des cétones, des phénols sont ainsi formés par photo oxydation et sont présents, du fait de leur grande hydrosolubilité, dans l'eau sous-jacente à la nappe d'hydrocarbures. Certains de ces composés sont très fortement toxiques pour les biocénoses et/ou cancérogènes.

☐ *Sédimentation*

La sédimentation a lieu quand la densité du pétrole est supérieure à celle de l'eau de mer. Divers processus interviennent dans l'augmentation de cette densité : évaporation et dissolution des composés les plus légers, dégradation et oxydation des paraffines, formations d'agrégats et adsorption du pétrole dispersé sur les particules en suspension ... Certains bruts, tels le "Bunker B" ou le pétrole sud-américain ont des densités proches de 1 ; ainsi, simplement associés à de faibles quantités de matière minérale, ces pétroles disparaissent rapidement de la surface par sédimentation.

De par leur très faible solubilité, les hydrocarbures aromatiques et aliphatiques, de masse moléculaire élevée, sont plus facilement adsorbés sur la MOP, et donc plus rapidement drainés vers les sédiments. En zone néritique, le phénomène sera plus important qu'en zone océanique, car la teneur en matières en suspension y est souvent plus grande. Au niveau du sédiment, l'importance relative des phénomènes d'enfouissement, de dégradation et de remise en suspension des hydrocarbures dépendra des conditions du milieu (profondeur, nature du sédiment, bioturbations, hauteur de la houle et force des courants, teneur en oxygène, nature, diversité et abondance des souches microbiennes).

☐ *Pénétration dans les chaînes trophiques*

De nombreuses espèces marines contiennent, naturellement, des taux plus ou moins élevés d'hydrocarbures. La contamination de ces espèces sera facilitée et sera fonction des organismes eux-mêmes et de la structure chimique des hydrocarbures auxquels ils sont exposés. Par ailleurs, les bactéries peuvent être des vecteurs de contamination : l'accumulation des hydrocarbures et/ou des produits de leur métabolisme sous forme de vésicules intracytoplasmiques a souvent été décrite après croissance sur substrat enrichi en ce type de molécules.

☐ *Biodégradation*

La biodégradation est un facteur essentiel dans l'élimination du pétrole. Après avoir indiqué les microorganismes intervenant dans ce processus et les méthodes de mesure de leur activité, nous décrirons schématiquement quelques voies métaboliques impliquées dans l'attaque des hydrocarbures et les paramètres qui vont influencer la biodégradation.

♦ Les microorganismes responsables de la biodégradation

Les hydrocarbures sont des produits naturels. De ce fait, les microorganismes capables d'attaquer ces molécules (hydrocarbonoclastes) sont ***partout présents et d'une grande diversité***. Leurs effectifs sont beaucoup plus importants dans les zones polluées de façon chronique (ports, "champs" pétrolifères, ...) et ***augmentent significativement après un apport d'hydrocarbures*** dans des sites primitivement dépourvus de contamination. Leur concentration est plus forte dans les ***sédiments*** que dans la colonne d'eau, à l'exception de la ***micro couche de surface***.

Depuis 1946 (travaux de ZoBell), on sait que de ***très nombreuses souches bactériennes*** sont hydrocarbonoclastes. Des études de taxonomie numérique ont même montré que la capacité à se développer sur milieux spécifiques serait acquises par des entérobactéries suite au transfert de plasmides. La composition et l'efficacité de la microflore sont fonction de l'origine du pétrole, des conditions climatiques et sont soumises aux variations saisonnières.

Parmi les microorganismes aptes à se développer sur hydrocarbures, les bactéries sont les plus abondantes. En se basant sur la fréquence d'isolement, les genres les plus fréquents sont : *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, ... Les sites contaminés contiennent également de nombreux **champignons et levures hydrocarbonoclastes** : *Aspergillus*, *Candida*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, ... Leur rôle dans la dégradation effective est controversé. Ils peuvent agir directement ou indirectement, en excréant des biosurfactants qui favoriseront l'action des bactéries (émulsion des hydrocarbures). Enfin signalons que certaines **micro algues** peuvent attaquer les hydrocarbures : l'exemple le plus spectaculaire est celui de *Protatheca zopfii* qui dégrade jusqu'à 40 % d'un pétrole brut.

♦ Mesure de l'activité hydrocarbonoclastique

Il n'existe pas obligatoirement une corrélation entre le nombre de microorganismes hydrocarbonoclastes (biomasse) et leur activité. La mesure de cette activité peut être envisagée in vitro ou in situ, ... et dans les deux cas, les résultats sont entachés d'erreurs. In situ, compte tenu de la lenteur des processus en cause, il est difficile d'apprécier l'importance des facteurs abiotiques et on doit, par ailleurs, supposer que la vitesse de dégradation est linéaire (or nous avons vu précédemment que cette hypothèse est fautive, d'autant plus qu'il faudrait tenir compte ici d'importants phénomènes de diauxie et d'inhibition qui se développent et évoluent avec le temps). In vitro, les paramètres peuvent être contrôlés mais il est toujours difficile dans ce cas d'extrapoler les résultats obtenus au milieu naturel. Les méthodes de mesure peuvent être directes ou indirectes :

- dosage et caractérisation du pétrole en début puis après des délais croissants d'expérience (complexité et longueur des analyses empêchent des études très détaillées)

- mesure de la consommation d'oxygène ou de l'apparition de CO_2 (mais on ne tient alors pas compte des oxydations partielles). Une autre approche consiste à doser le $^{14}\text{CO}_2$ émis à partir d'un composé marqué (mais on n'envisage alors qu'un seul composé, sans tenir compte des interactions naturelles).

Dans le tableau 4.5 sont regroupés quelques résultats acquis suivant les méthodes précédentes. Il est difficile de comparer les valeurs obtenues, par suite de la diversité des conditions expérimentales. On peut en effet aboutir à des conclusions différentes en fonction de l'approche méthodologique. Par exemple, Gibbs, sur un même échantillon, trouve un taux de dégradation de 26 % à partir de la mesure de l'oxygène consommé et 44 % après dosage du pétrole résiduel.

Tableau 4.5 : Dégradation des hydrocarbures in situ et in vitro.

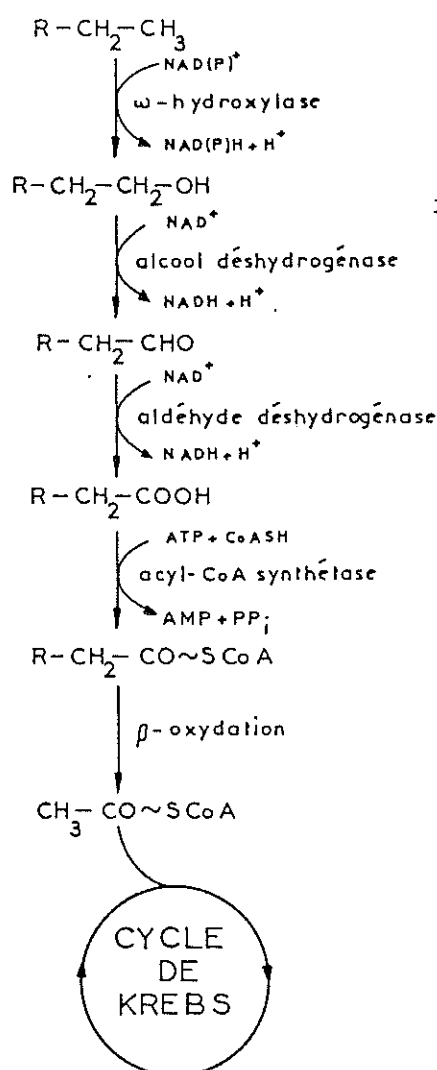
Référence	Pourcentage de dégradation	Activité	Conditions expérimentales
Atlas et Bartha (1973a)	71	310 g/m ³ /j	Eau de mer. <i>In vitro</i> - MNR- à 28°C Pétrole : Louisiane du Sud M.A : dosage du pétrole résiduel
Bertrand et col. (1986)	78 ^a 33 ^b	2.6 g/m ³ /j 1.1 g/m ³ /j	Sédiments superficiels. <i>In vitro</i> - système à flux continu à 20°C. M.A : dosage du substrat résiduel. a) C ₂₀ b) pristane
Berwick (1984)	87	1100 g/m ³ /j	Eau de mer. <i>In vitro</i> - MNR- à 20°C Pétrole : fraction aliphatique d'un pétrole iranien M.A : dosage des hydrocarbures résiduels
Dibble et Bartha (1976)	70	1100 g/m ³ /j	Eau de mer. <i>In vitro</i> - MNR- à 28°C Pétrole : Louisiane du Sud M.A : dosage du pétrole résiduel
Gibbs et Davis (1976)	-	0.26 g/m ² /j	Sédiment. <i>In vitro</i> - système à flux continu. Colonne de sable percolée par de l'eau de mer à 12°C M.A : consommation d'oxygène
Gibbs et col. (1975)	-	0.08 g/m ³ /j (14°C) 0.03 g/m ³ /j (4°C)	Eau de mer. <i>In situ</i> - substrat : résidus d'un pétrole brut (Koweït) M.A : consommation d'oxygène
Mattei et col. (1986)	84	7680 g/m ³ /j	Eau de mer. <i>In vitro</i> - culture continue à 30°C Pétrole : Asthart M.A : dosage du pétrole résiduel
Reisfeld et col. (1972)	81	27 g/m ³ /j	Eau de mer. <i>In vitro</i> - MNR- à 32° Pétrole : Iranien M.A : dosage du pétrole résiduel.
Seki (1976)	-	0.03 g/m ³ /j	Eau de mer. <i>In situ</i> M.A : ¹⁴ CO ₂ formé à partir de n ¹⁴ C ₂₀
Soli et Bens (1972)	50	1250-2500 g/m ³ /j	Eau de mer. <i>In vitro</i> - MNR à 26°C Pétrole : Louisiane du Sud M.A : dosage du pétrole résiduel

MNR : milieu non renouvelé
MA : mesure de l'activité

♦ Les voies métaboliques

Nous ne discuterons pas les divers mécanismes de la dégradation bactérienne en fonction des types bactériens, mais seulement les principales voies d'attaque microbienne suivant les différentes familles d'hydrocarbures. De très nombreux travaux ont été consacrés à ce sujet et notre approche ne pourra illustrer que quelques aspects de cet important problème.

a.- les n-alcanes



Les n-alcanes en C9 ou plus sont les hydrocarbures les plus facilement dégradables par une très large variété de microorganismes. Plusieurs modes d'attaque ont été décrits et font tous intervenir l'oxygène moléculaire. Le principal et le plus fréquent est celui correspondant à une oxydation du groupe méthyle terminal, conduisant à la formation d'un alcool primaire, d'un aldéhyde puis d'un acide monocarboxylique. Il est ensuite dégradé par β -oxydation et intègre le cycle de Krebs.

4.17 Biodégradation des n-alcanes

b.- les alcanes ramifiés

La dégradation des alcanes ramifiés est plus lente et plus difficile comparativement à celle des n-alcanes. La présence d'un groupement méthyle en position β conduit à une oxydation en position α ou ω . Par contre, deux groupements méthyles, chacun en position β des extrémités de la chaîne (ramification anteiso) bloquent la dégradation. L'oxydation des alcanes ramifiés commence généralement par l'extrémité de la chaîne la plus éloignée de la ramification. Par β oxydation, la dégradation peut se poursuivre jusqu'à la ramification. Une ω oxydation intervient alors.

c.- les cyclo-alcanes

Cette famille d'hydrocarbures est beaucoup plus difficilement dégradable que les deux précédentes. Toutefois les expériences démontrant de façon non équivoque la biodégradation des naphènes sont très limitées. Le fait que l'on assiste pas à l'accumulation de ces composés dans le milieu marin implique leur dégradation, peut être par des voies non conventionnelles (phénomènes de co-oxydation, action synergie de souches dont l'arsenal enzymatique est complémentaire, ...).

d. - les hydrocarbures aromatiques

De nombreux microorganismes sont capables d'effectuer cette dégradation. En effet, les chaînes enzymatiques existent chez la plupart des êtres vivants, bactériens ou multicellulaires. Elles dérivent des chaînes de synthèse et de dégradation des acides biliars (shikimate, ...) ou du métabolisme des acides aminés (tryptophane, phénylalanine, tyrosine, ...).

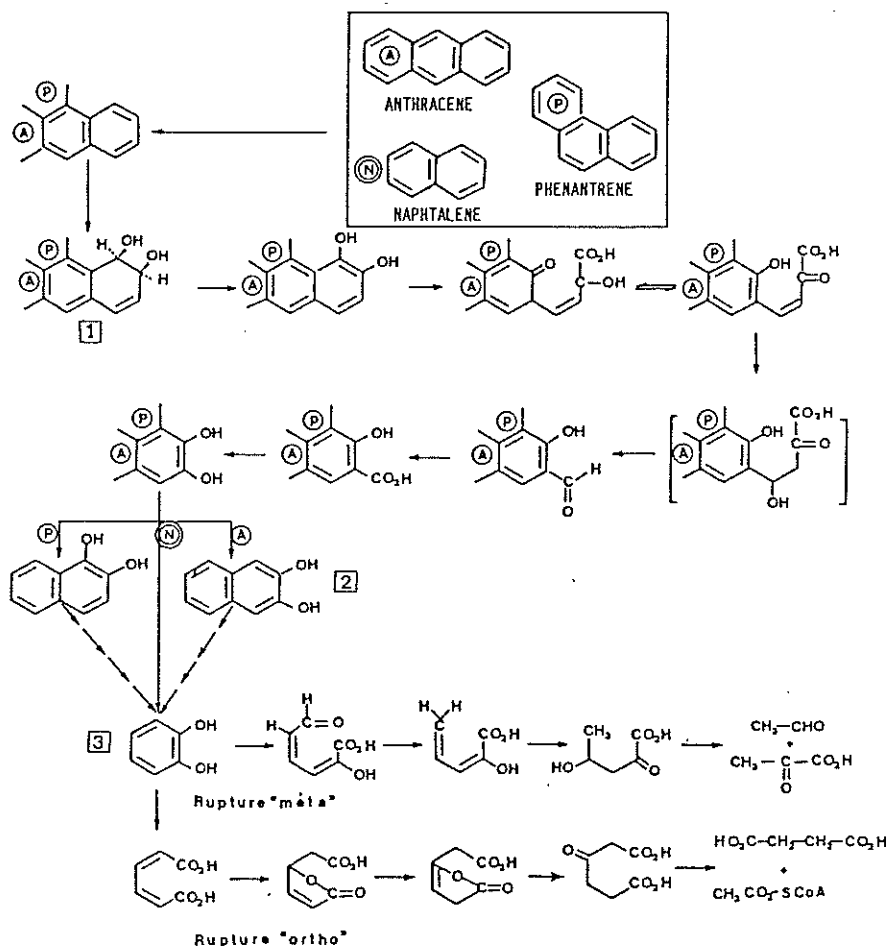
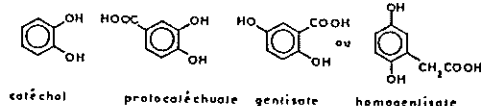


Fig. 4.18 Biodégradation des hydrocarbures aromatiques.

(A) anthracène, (P) phénanthrène, (N) naphtalène,
[1] diols, [2] dihydroxynaphtalène, [3] catéchol.

L'oxydation des composés aromatiques aboutit, dans un premier temps à un des composés suivants catéchol, protochatéchuate, gentisate ou homogentisate à un seul cycle aromatique.



La première étape est l'oxydation du cycle grâce à une dioxigénase qui provoque l'apparition d'un diol. Dans un second temps, il y a clivage du cycle, soit entre les deux C portant les hydroxyles

(orthofission) soit entre un C hydroxylé et l'autre pas (métafission) avec obtention d'un nouveau diol ayant un cycle de moins que la molécule originelle. L'opération peut alors se répéter. L'oxydation ultérieure de ces molécules aliphatique conduit à des composés

tels le pyruvate, le fumarate, le succinate ou l'acétyl-CoA qui entrent dans le cycle de Krebs (Fig. 4.17 et 4.18).

4.3.3 Approches expérimentales de la dégradation des hydrocarbures

□ *Expériences en milieu non renouvelé*

Les conclusions concernant la biodégradation des pétroles proviennent le plus souvent d'expériences en milieu confiné, le plus souvent dans des conditions optimales de croissance (température, aération, apport de nutriments azotés et phosphorés, ...), en utilisant des souches pures ou des communautés bactériennes "naturelles".

De l'ensemble de ces expériences ressort que les différents hydrocarbures sont attaqués à des vitesses différentes : la vitesse et le pourcentage de dégradation augmentent dans le sens fraction saturée (alcanes) > fraction aromatique > fraction asphaltique. Dans le cas des composés aromatiques, les possibilités d'élimination diminuent avec le nombre de noyaux. La composition du pétrole va donc changer avec le temps. A cette évolution de la composition chimique va correspondre un changement dans le nombre et la nature des bactéries composant la communauté. On constate également l'apparition de composés toxiques susceptibles d'inhiber la croissance microbienne et qui pourraient justifier l'accumulation de composés totalement réfractaire dans ce type d'expériences (résines, asphaltènes).

Les temps de demi-vie, dans des sédiments oxygénés expérimentaux et toutes choses étant égales (simulation d'une pollution aiguë de type échouage), est de l'ordre de :

naphtalène	71 h
anthracène	400 h
benzanthracène	10000 h
benzopyrène	30000 h

Les informations ainsi obtenues sont très intéressantes mais ne donnent qu'une vue simpliste des événements qui vont intervenir en milieu naturel.

□ *Expériences en culture continue*

Une étape dans la compréhension fine du problème peut être franchie en utilisant des systèmes qui renouvellent le milieu de culture (v. Fig. 4.19).

Dans ces conditions on constate une attaque simultanée des n-alcanes et des aromatiques. Dans des conditions optimales de croissance, le pourcentage de dégradation global est de 80 %, les différents composés étant plus ou moins affectés :

n-alcanes saturés	90 %
aromatiques	78 %
polaires	60 %
asphalténiques	65 % (correspondant à une oxydation catalytique se traduisant par l'apparition de molécules qui se retrouvent dans la fraction polaire)

Ces résultats tendent à prouver que toutes les molécules présentes dans un pétrole brut sont attaquables par les enzymes de la microflore naturelle "normale".

De telles approches ont aussi permis d'étudier l'efficacité (et la toxicité ... !) des dispersants utilisés pour lutter contre les marées noires. Ces détergents ont prouvé leur efficacité, tant sur le terrain qu'au laboratoire.

En effet, la biodégradation dépend de l'état de dispersion du pétrole et elle est optimale quand le substrat se présente soit sous forme dissoute, soit sous forme de micro émulsion. Cet état va accroître la surface de contact entre le pétrole et l'eau de mer, favoriser le transfert d'oxygène et l'apport d'éléments nutritifs nécessaires au développement des microorganismes. En conditions naturelles, la croissance de microorganismes sur ce type de substrat implique la production de molécules possédant des propriétés tensioactives, appelées biosurfactants. En pleine eau, la quantité de biosurfactants produite ne peut assurer l'émulsification que d'une très faible quantité d'hydrocarbures. A l'inverse, dans la micro couche de surface, la concentration en hydrocarbures et en bactéries hydrocarbonoclastes est souvent très élevée et, par voie de conséquence, la production de biosurfactants sera importante. L'action conjuguée de ces molécules, des vagues et des vents, va entraîner la dispersion du pétrole et accélérer son assimilation par les microorganismes.

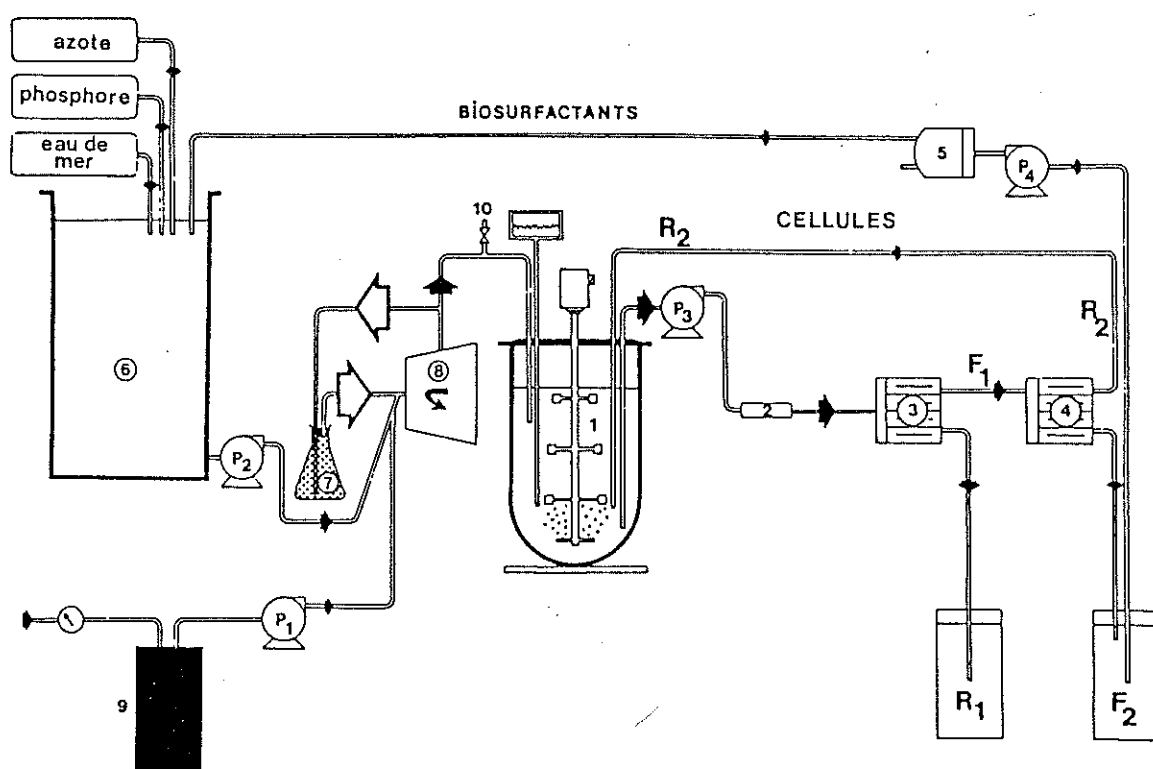


Fig. 4.19 : Schéma du dispositif expérimental utilisé pour la dégradation en continu d'un pétrole brut. Le pétrole est émulsionné par les biosurfactants excrétés par la communauté bactérienne avant d'être introduit dans le fermenteur. On peut également y adjoindre un dispersant artificiel.

(1) réacteur ; (2, 3, 4 et 5) filtres ; (6) réservoir d'eau de mer enrichie en nutriments ; (7) réservoir de préémulsification ; (8), p1, p2, p3, p4 pompes ; (9) réservoir de pétrole brut ; R1, R2, F1, F2 boucles de contrôle de la biomasse et des composés générés.

L'utilisation de dispersants artificiels "étale" sur toute la colonne d'eau la zone optimale de biodégradation et ainsi favorise la désintégration et la biodégradation des nappes. D'un autre côté, certains de ces dispersants sont ... nettement plus toxiques pour les biocénoses que le pétrole lui-même. De nombreux dérivés issus de la biodégradation de ces détergents sont, eux aussi, toxiques à doses très faibles.

□ Expériences in situ

Quelques expériences de terrain ont été menées pour essayer d'intégrer les variations naturelles des conditions de l'environnement. Dans l'exemple choisi, l'application de pétrole brut indonésien ("Handil") a été effectué sur un sédiment de mangrove pollué de façon chronique à bas niveau (60 à 110 ppm), sur l'île de Kalimantan (Bornéo). On a "simulé" des conditions d'échouage d'un pétrolier sur deux parcelles de 100 m² environ, vaporisées, l'une au seuil 2.2 l/m², soit une concentration initiale de 9400 µg/g séd (parcelle A), l'autre au seuil de 6.6 l/m², soit 28200 µg/g séd sur une épaisseur de 15 cm (parcelle B).

La composition du brut "Handil" est illustrée à la figure 4.20. Ce pétrole est très paraffinique, riche en n-alcanes à longues chaînes (C₂₀-C₃₅). La teneur en pristane (isoprénoïde C₁₈) est élevée, cas typique des pétroles indonésiens. Les isoalcanes sont bien représentés (*), de même que les alcanes polycycliques, stéranes et terpanes (X, Y, 1, 2, 3, 4). Les aromatiques les plus abondants sont les alkyl-naphtalènes.

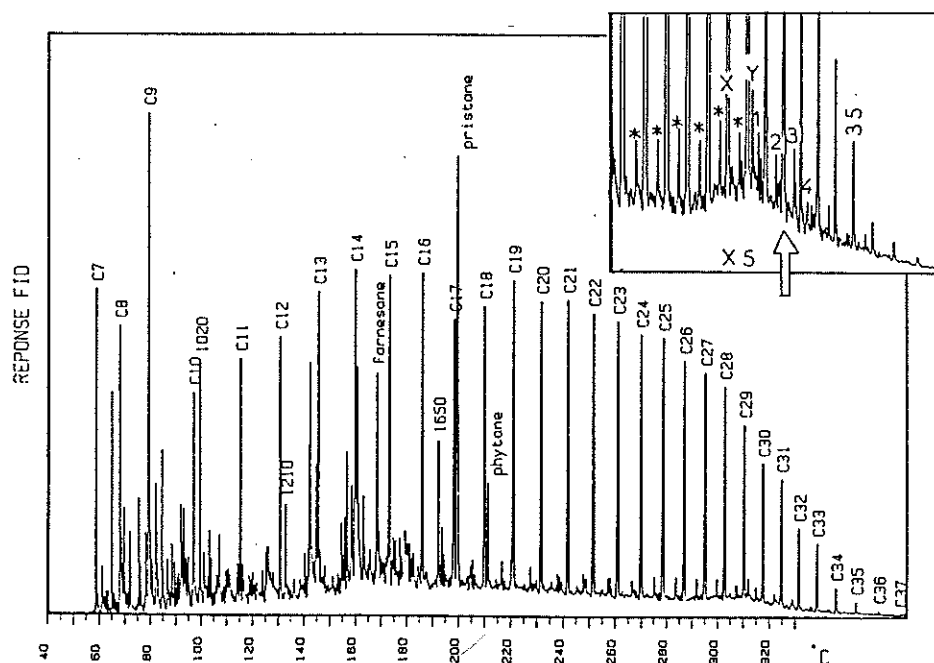


Fig. 4.20 : Analyse du brut "Handil" en chromatographie en phase gazeuse

Lors des retraits ultérieurs on s'est aperçu que le pétrole n'avait infiltré que la couche des 15 premiers centimètres du sédiment. Dans cette couche, le potentiel redox a été abaissé et la zone anoxique s'est rapprochée de la surface, suite à la consommation d'oxydants (oxygène et autres) lors de la dégradation des hydrocarbures.

Les résultats de l'analyse IR de la dégradation du pétrole au cours du temps sont représentés à la figure 4.21 (parcelle A à gauche, parcelle b à droite) pour 4 sous-échantillons.

Après une phase très rapide de disparition des hydrocarbures durant les premiers mois, on observe une décroissance régulière, bien que des différences importantes se révèlent entre les sous-échantillons. Attirons l'attention sur le fait que cette décroissance résulte à la fois des phénomènes d'évaporation (responsables de la décroissance initiale) et de photo-oxydation à marée basse, de dissolution et de "lavage" par les vagues à marée haute, et de biodégradation.

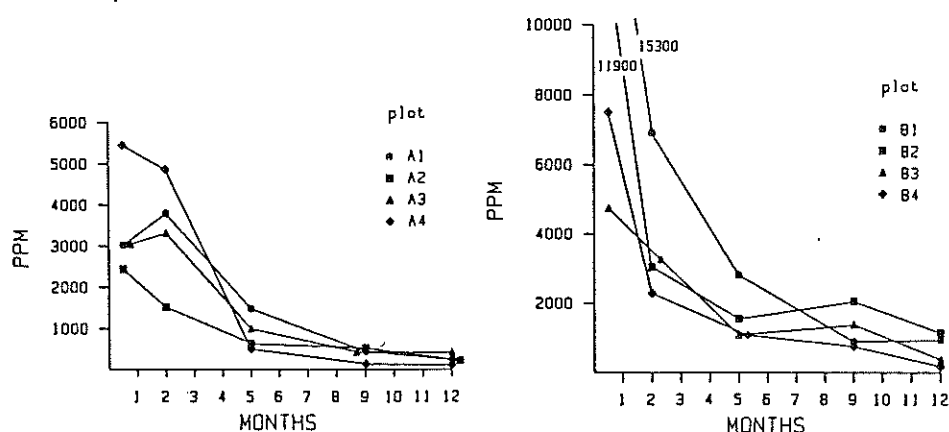


Fig. 4.21 Dégradation du pétrole au cours du temps (4 sous échantillons) :
parcelle A à gauche, parcelle B à droite.

Du seul point de vue de la biodégradation, il est possible de décrire cinq étapes correspondant à des phases dans le processus de biodégradation. Ces étapes se succédant modifient la composition du pétrole restant. La figure 4.22 illustre par des chromatogrammes la composition du brut "Handil" au cours de ces étapes.

Toutes les valeurs sont reportées par rapport au stade 0, correspondant au brut initial (fig. 4.20) débarrassé des composés les plus légers par évaporation (jusqu'à C₁₄). On peut décrire le processus comme suit (tableau 4.6) :

- ♦ les *n-alcanes* sont rapidement et totalement éliminés durant les phases 1 à 3
- ♦ ils sont suivis des *iso-alcanes*, attaqués dans un second temps et complètement dégradés à l'issue de la phase 4
- ♦ les marqueurs biologiques (alcanes polycycliques, stérane et terpènes) sont les seuls composés résolus en chromatographie présents au stade 5. Le *pristane* est attaqué seulement après élimination totale des *n-alcanes*. Il est totalement dégradé total à l'issue du stade 5
- ♦ la persistance des *alcanes polycycliques* et des *aromatiques* (non détectés par chromatographie) témoigne de leur faible potentiel de biodégradation. Elle commence au stade 3 (5 % de dégradation) pour atteindre un maximum de 30 % à l'issue du stade 5, essentiellement les composés de poids moléculaire intermédiaire.
- ♦ les *asphaltènes* ne semblent pas attaqués.

Tableau 4.6 Marqueurs chromatographiques des étapes de biodégradation.

TYPE	n-alcanes	Iso-alcanes	Pristane	Terpènes	Alcanes polycycliques Aromatiques
Stade 1	+++	+++	+++	+	+
Stade 2	++	+++	+++	+	+
Stade 3	+	++	++	++	++
Stade 4	-	+	+	++	++
Stade 5	-	-	-	+++	+++

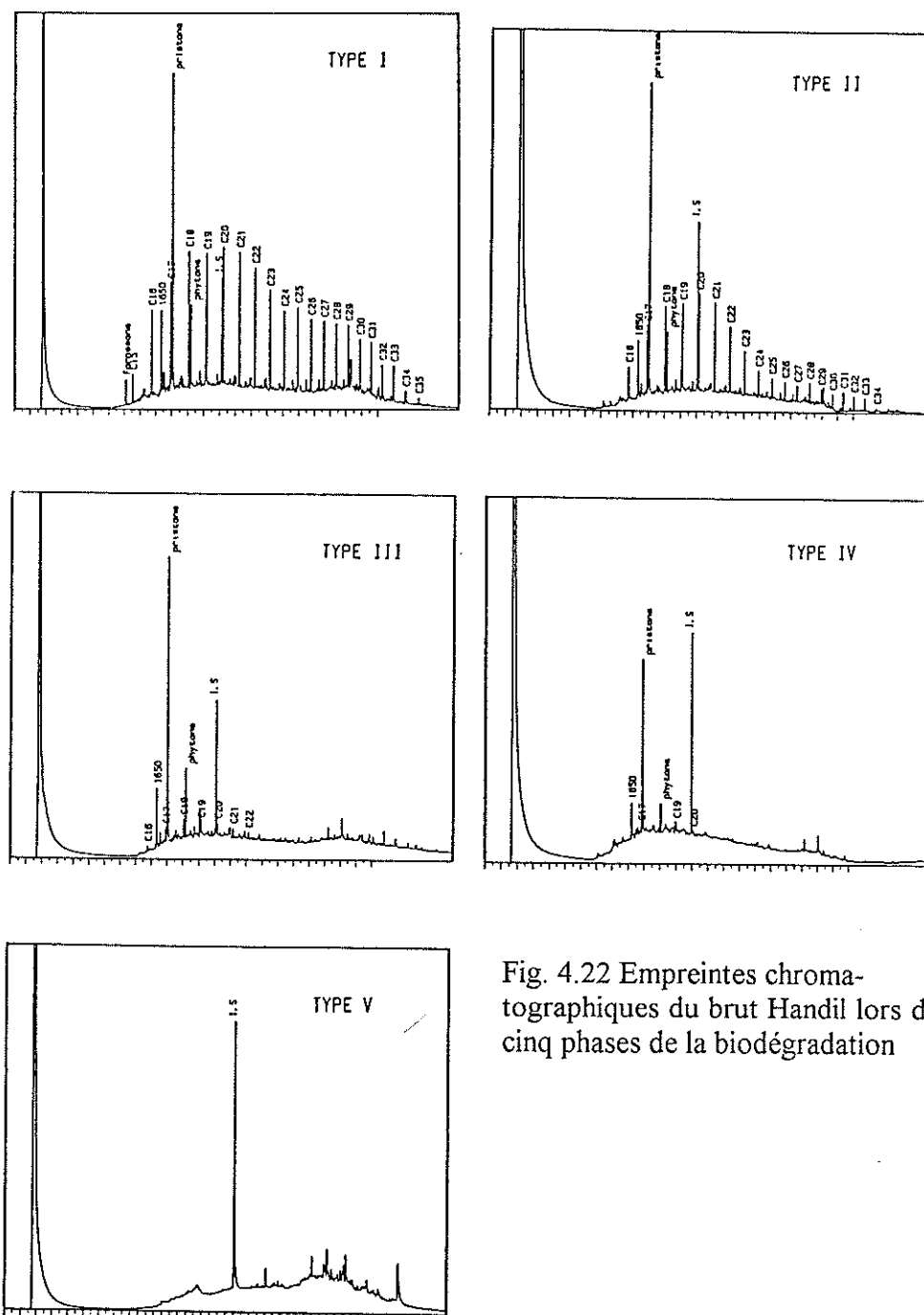


Fig. 4.22 Empreintes chromatographiques du brut Handil lors des cinq phases de la biodégradation

On peut visualiser le devenir de ces fractions sur les graphiques de la Fig. 4.23

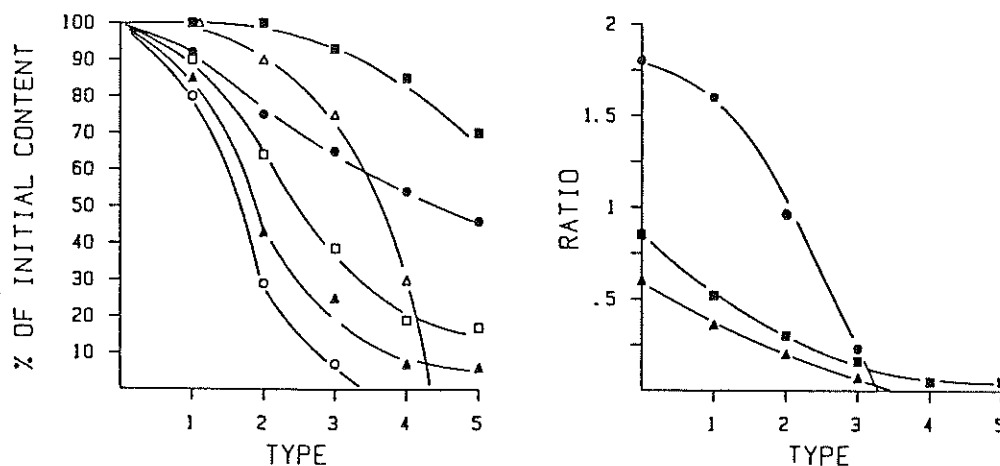


Figure 4.23 : Dégradation des fractions d'hydrocarbures en fonction des stades de biodégradation.

A gauche : ● hydrocarbures totaux ; ■ composés non résolus (polycycliques et aromatiques) ; △ somme de tous les pics résolus en chromatographie ; ○ n-alcane ; □ iso + cyclo-alcane ; △ pristane.
A droite : ● n/iso-alcane ; ■ Somme des pics résolus/composés non résolus ; △ C17/pristane.

De l'examen général des données, il ressort que les processus physiques sont déterminants pour la décontamination du sédiment : environ 90 % de la charge polluante est ainsi éliminée par évaporation (65 %) durant les phases initiales puis par "lavage" par les vagues et la marée. Ceci correspond à l'élimination du pétrole le moins fermement adsorbé aux particules sédimentaires, aisément relargué et ... redéposé plus loin !

Il s'agit donc plutôt d'une mobilisation et une redistribution de la charge polluante. L'essentiel de la décontamination est le fait de la biodégradation. Les souches bactériennes isolées sont *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Acinetobacter*. Les fungi sont représentés par *Aspergillus* et *Trichoderma*. La biodégradation sur le site expérimental n'est responsable que de 2 à 9 % de la disparition des hydrocarbures (sous-estimation liée à la non prise en compte de la biodégradation des 90 % redistribués en dehors des parcelles expérimentales). Le taux de biodégradation a été trouvé pratiquement constant, à 12-16 g d'hydrocarbures par mètre carré et par mois (d'autres expériences ont trouvé des valeurs entre 8 et 24 g/m²/mois pour d'autres écosystèmes). Les séquences de biodégradation observées *in vitro* recoupent bien les données acquises *in situ* (stades de biodégradation) avec un certain recouvrement des cinétiques concourant à une optimisation du processus.

4.4 Biodégradation des plastiques

L'utilisation des matières plastiques s'est accrue de façon exponentielle durant ces quelques dernières années. Environ 4 % de la production mondiale de pétrole est utilisée pour fabriquer l'un ou l'autre des polymères "plastiques" dont il va être question. La tendance à la substitution des métaux se traduira encore, dans l'avenir, par un développement de la proportions de plastiques (doublement de la consommation en

Suisse de 1970 à 1980). Alliant d'excellentes propriétés chimiques (inaltérabilité, résistance, ...) à un faible coût de revient, ils sont devenus la panacée pour qui à quoi que ce soit à emballer. Mais ces avantages ont leurs revers : cette inaltérabilité chimique et les propriétés de résistance de ces matériaux ... les rendent presque indestructibles dans le milieu naturel, et le milieu marin en particulier. Le caractère "biodégradable" d'une structure n'a pas rigoureusement le même sens pour un industriel, un chimiste ... et un biologiste. Si certaines "matières plastiques" ont un taux de biodégradation raisonnable (et mesurable) dans le milieu naturel, il n'en est pas de même de beaucoup d'autres molécules dont le traitement après utilisation est encore très coûteux (donc autant que possible évité ...) ou est générateur de pollutions plus importantes encore (par leur incinération par exemple générant des molécules chlorées ou nitrilées très toxiques).

Les plastiques appartiennent à un grand nombre de groupes de composés chimiques aux propriétés très variables. Les principaux types de molécules sont les suivants :

□ **Polyamide** ex. Nylon $-\text{CO}[\text{NH}-(\text{CH}_2)_5-\text{CO}]_n-\text{NH}-(\text{CH}_2)_5-$

Ils peuvent être synthétisés par polycondensation d'un acide aminé (pas forcément un AA "biologique" !) ou par polyaddition d'un lactame (ex. le Nylon 6). Ils sont très cristallins, possèdent des caractéristiques mécaniques remarquables, dues en particulier aux liaisons hydrogène s'établissant entre les chaînes. On les utilise sous forme de fibres textiles et de pièces mécaniques.

□ **Polycarbonates** $-\text{[R-O-C-O]}_n-$

$$\begin{array}{c} \parallel \\ \text{O} \end{array}$$

Les polycarbonates forment une famille de polyesters se caractérisant par un point de fusion relativement élevé, une excellente résistance mécanique et des propriétés diélectriques intéressantes. Ils sont transparents et peuvent donner lieu à un grand nombre d'applications techniques.

□ **Polyuréthannes** $-\text{O}[\text{R}_1-\text{O}-\text{C}-\text{NH}-\text{R}_2-\text{NH}-\text{C}-\text{O}]_n-\text{R}_1-\text{O}-$

$$\begin{array}{cc} \parallel & \text{O} \\ \text{O} & \end{array}$$

Les polyuréthannes sont obtenus par réaction entre des isocyanates et des diols, des polyols ou des polyesters contenant des radicaux hydroxyles. Lorsque les alcools ou les isocyanates ont une fonctionnalité supérieure à 2, on obtient un produit tridimensionnel (réticulation entre les chaînes). En faisant varier la nature des groupements R_1 et R_2 et le taux de réticulation (abondance des composés ternaires), on fabriquera une large gamme de composés thermoplastiques (linéaires) ou élastomères (taux de réticulation variable), couvrant un éventail important d'applications : vernis, colles, mousses souples et rigides, fibres, ... utilisées dans de très nombreuses conditions.

On remarquera la similitude avec les polyamides (possibilité de liaisons hydrogène entre chaînes) et surtout la présence de liaisons de type peptidique ($-\text{CO}-\text{NH}-$) susceptible de dégradation par certaines protéases à large spectre.

□ **Polystyrène** $-\text{[CH}_2-\text{CH}]_n-$

$$\begin{array}{c} | \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$$

Le polystyrène est un matériau transparent, résistant bien aux acides et aux bases, excellent isolant mais d'une grande fragilité mécanique. On l'utilise pour faire des jouets, des récipients jetables (vaisselle, ...) des isolants électriques et thermiques (expansé, gaz parfois riche en CFC). Pour essayer de diminuer sa fragilité, on l'a associé, sous forme de

mélange ou de copolymère, à différents autres produits (butadiène donnant le "polystyrène choc", butadiène-acrylonitrile donnant l'ABS, ...). Vu leur résistance aux chocs, on les utilise pour la fabrication d'ustensiles ménagers, de carrosseries de voitures.

☐ *Polyéthylène* $-[\text{CH}_2-\text{CH}_2]_n-$

Le polyéthylène possède une remarquable inertie chimique allée à un fort pouvoir d'isolement électrique. On l'utilise surtout sous forme de films d'emballage, pour la fabrication d'articles ménagers et de jouets, de tuyaux et d'isolations pour câbles électriques.

Exposé à certains rayonnements ionisants, le polyéthylène peut se réticuler, ce qui a pour conséquence d'augmenter encore sa résistance thermique et sa stabilité chimique.

□ *Polypropylène* $-\text{[CH}_2\text{-CH]}_n\text{-}$
|
 CH_3

Le polypropylène, très cristallin, possède des propriétés mécaniques supérieures à celles des polyéthylènes, par contre il est plus fragile à des températures voisines de 0°C. Il est très utilisé dans diverses industries : automobile, appareils électroménagers, isolation électrique, tuyaux pour le transport de l'eau chaude (stabilité thermique > 150°C).

☐ Chlorure de polyvinyle (PVC) $\text{--[CH}_2\text{--}\underset{\text{Cl}}{\text{CH}}\text{]}_n\text{--}$

Le PVC est, avec le polyéthylène, le polymère le plus important sur le plan du tonnage commercialisé. Il possède de bonnes propriétés mécaniques et une relative inertie chimique. Toutefois, sa faible stabilité thermique et photochimique impose l'utilisation de stabilisants. L'un de ses principaux avantages est sa compatibilité avec un grand nombre de plastifiants, de charges et d'adjuvants divers, ce qui permet de faire varier à l'infini ses propriétés physiques et chimiques et donc de les adapter à un grand nombre de situations. Rigide (non plastifié), il est surtout utilisé pour la fabrication de plaques et de feuilles, de bouteilles (eau minérale), ou dans la construction (tuyaux, châssis, ...). Souple (plastifié), il est surtout utilisé pour la fabrication de films, de revêtements de sols, de tissus enduits et de gaines électriques.

□ *Polyméthylmétacrylate* (PMMA)

$$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{-(CH}_2\text{-CH-)}_n\text{-} \\ | \\ \text{C=O} \\ | \\ \text{O-CH}_3 \end{array}$$

C'est un polymère amorphe, remarquablement transparent et résistant aux intempéries. On peut le couler sous forme de plaques, le mouler, ... On utilise beaucoup le PMMA dans la fabrication d'enseignes, de vitres "Securit", de coupoles transparentes (aviation, bateaux, ...). Son extrême stabilité biologique lui vaut d'être utilisé pour la confection de prothèses (lentilles intracristallines, ...). Il est commercialisé sous différentes appellations : Plexiglas, Altuglas, Lucite, Perspex, ...

Les composés macromoléculaires sont rarement utilisés à l'état pur. Les adjuvants utilisés, même présents en quantité relativement faible sont très importants du point de vue écologique, vu leur nature ou leurs propriétés : sels de métaux lourds, composés phénoliques, voire PCBs.

On peut distinguer plusieurs sortes d'adjuvants :

♦ *adjuvants destinés à faciliter la mise en oeuvre :*

- *plastifiants* : augmentent la fluidité du matériau fondu
- *stabilisants thermiques* : protection du matériau lors du passage à haute température
- *antioxydants* : phénols substitués, amines aromatiques, ... mélanges généralement complexes à effet synergique empêchant la dégradation oxydative du composé avant polymérisation
- *additifs spécifiques* : les caractéristiques de thermolyse du PVC entraînent l'utilisation de sels organiques de métaux lourds (stéarates, laurates, ... de baryum, cadmium, plomb ou zinc) dans un but de stabilisation.

♦ *adjuvants destinés à modifier les propriétés mécaniques*

- *plastifiants* : réduisent la rigidité ou augmentent la souplesse du matériau polymérisé. Il s'agit de molécules encombrantes qui s'insèrent entre les chaînes et réduisent les forces intermoléculaires, donc diminuent la cohésion thermomécanique du matériau. Il s'agit d'esters lourds (phtalate de dioctyle), soit de polyesters à faible degré de polycondensation, soit, le plus souvent, de composés organiques chlorés (PCBs, paraffines polychlorées, ...).
- *charges* : les caractéristiques mécaniques des résines peuvent être considérablement modifiées par introduction de produits minéraux ou végétaux appelés "charges". On peut, en particulier, améliorer la dureté superficielle, la résistance au rayonnement UV ... en incorporant des charges granulaires (amiante, poudre de verre, poudre d'aluminium, billes creuses en résines phénoliques, ...). Les charges fibreuses sont essentiellement constituées de fibres de verre et de carbone introduites pour améliorer la résistance et la rigidité des polyesters, polyamides et polycarbonates.

♦ *adjuvants destinés à modifier certaines propriétés physiques ou chimiques*

- *colorants et pigments* de natures très variées
- *agents fongicides*
- *agents d'extinction* (inhibiteurs de combustion) : dérivés organiques halogénés ou phosphorés, oxydes d'antimoine, ...

Outre la composition même du polymère (nature des liaisons), ce sont souvent ces **adjuvants qui conditionneront la biodégradabilité des plastiques et la nocivité de leur impact sur l'environnement**, que ce soit par accumulation, biodégradation ou incinération.

Le *PVC* s'est montré partiellement biodégradable en conditions naturelles. Toutefois, il apparaît à l'examen des données que seul un additif plastifiant (di-isooctyl sebacate, DIOS) ajouté à raison de 50 g d'additif pour 100 g de polymère subit une dégradation significative. Cette dégradation peut entraîner une perte de poids du matériel mis en expérience (avec des cultures pures) pouvant aller jusqu'à 10 % du poids de départ, en 15 jours. Ceci correspond à 65 % de dégradation du DIOS. Cette dégradation entraîne une diminution de la plasticité du polymère qui, devenant cassant et fragile est rapidement pulvérisé dans des conditions naturelles. Cette pulvérisation ne relève évidemment pas d'un vrai phénomène de biodégradation. Les bactéries des genres *Brevibacterium* et *Pseudomonas* se sont montrées les plus actives. *Pseudomonas* utilisée

seule n'a qu'une activité faible mais elle potentialise et accélère la dégradation par *Brevibacterium*, probablement en dégradant plus avant un des produits de la réaction. *Brevibacterium* peut utiliser le DIOS comme seule source de carbone en milieu minéral. Les *polyuréthannes* et, dans une moindre mesure, les *polyamides* sont rapidement dégradés par certaines souches de bactéries et de nombreux fungi ... ce qui a conduit les fabricants à incorporer comme additif des stabilisants agissant comme fongicides. Ici encore, il semblerait que les composés les plus biodégradables soient les additifs incorporés au polymère pour assurer stabilité, transparence, ... Toutefois, la disparition de ces additifs réduit la résistance du polymère qui peut alors subir une biodégradation selon des modalités et avec une vitesse qui restent à préciser dans le milieu marin (la nature de la liaison peptidique est vraisemblablement à la source des facilités d'hydrolyse de ces polymères). Les fungi filamenteux (Pyrénomycètes : *Haligena*, *Lulworthia*, *Corollospora*, et Fungi Imperfecti, *Zalerion*) pénètrent le polyuréthane et y creusent des galeries de 5 à 15 μm de diamètre et jusqu'à 1 mm de profondeur concourant à fragiliser le substrat..

La biodégradabilité des autres polymères n'est pas encore suffisamment étayée par des données expérimentales en milieu marin pour que nous puissions nous y attarder. L'essentiel des données proviennent des laboratoires des firmes productrices de polymères, ... pour lesquelles les notions de "biodégradabilité" et "toxicité environnementale" ne recouvrent pas les mêmes concepts que ceux des écologistes expérimentaux. Derrière ces termes se cachent de nombreuses interprétations et plusieurs phénomènes.

□ la **fragmentation** transforme le produit en paillettes, détruit ses propriétés mécaniques mais ne constitue pas une destruction totale. Des produits seulement "fragmentables" ont été présentés comme étant "biodégradables" même si les fragments générés ont une longue rémanence environnementale (cas des PVC par exemple).

□ la bioassimilation doit conduire à la réduction du polymère en composés simples (eau, CO_2 , CH_4 , ...). Certains produits dits "biodégradables" contiennent des phases *partiellement bioassimilables*, laissant persister des *molécules très stables* et ... éventuellement toxiques pour l'environnement.

Signalons encore de nombreux travaux récents (émanant de laboratoires dépendant de la pétrochimie : Elf-Atochem, ICI, Montedison, ...) visant à **mettre au point des polymères ayant de très bonnes propriétés mécaniques alliées à une biodégradabilité élevée** (> 95 % en moins de 3 mois). Ces polymères (Biopol, par exemple, fabriqué en Angleterre par ICI), à base de déchets végétaux (cellulose de maïs, ...) sont encore malheureusement encore fort chers en raison de la faible production (300 tonnes en 1992, coûtant environ 1200 Fb/Kg contre 30 à 40 Fb pour les autres polymères de synthèse). Ils allient de bonnes propriétés physicochimiques à une biodégradabilité élevée. Leur mise sur le marché a été effectuée (flacons de produits cosmétiques, rasoirs jetables, couches culottes, ... en Allemagne, au Japon et aux USA). Leur percée reste toutefois confidentielle à l'heure actuelle.

Il est vraisemblable que l'**évolution des réglementations européennes** en matière de gestion des déchets décidera de l'avenir des plastiques biodégradables.

4.5 Biodégradation des ciments et bétons

On sait que des communautés microbiennes peuvent s'établir et proliférer dans les ciments et bétons, de différentes compositions, pour autant que le milieu soit humidifié en permanence (d'eau douce ou d'eau de mer).

Suite à cette attaque, le béton est transformé en une masse pulvérulente dont la résistance (en unités internationales) passe de 50 MPa à environ 0.05 MPa. Sa teneur en

eau passe, dans les mêmes conditions de 0.3 à plus de 11 % en poids et sa porosité de 9.4 à ... 45 %.

Des mesures de densités de microorganismes ont montré que les zones non corrodées ne présentaient qu'une très faible contamination. Avec l'avancement de la biodégradation, la composition et les densités de microorganismes changent radicalement. Les zones corrodées sont envahies de thiobacilles ($6 \cdot 10^3$ à 10^6), de bactéries sulfatoréductrices ($9 \cdot 10^3$ à 10^5) et nitrifiantes ($6 \cdot 10^2$ à 10^5) et de cyanophycées. Des bactéries hétérotrophes sont également présentes en abondance (10^6 à $3 \cdot 10^7$ /g). Des champignons ont été détectés en faible densités (10^2 à 10^3 cell./g).

Les formes les plus abondantes sont représentées par *Thiobacillus*, *Nitrosomonas*, *Nitrosospora*, *Nitrobacter*, *Pseudomonas* et *Synechococcus* (cyanophycée).

Il semblerait que les *Pseudomonas* (hétérotrophes) utilisent les lignosulfates ajoutés au béton comme cryoprotecteur et imperméabilisant.

L'analyse des ciments a permis d'élucider partiellement le mécanisme de cette dégradation dont l'importance économique est évidemment fondamentale en génie maritime.

Les résultats d'une approche expérimentale confirment les mesures effectuées sur du matériel collecté in situ. (Tableaux 4.7 et 4.8). La diminution de pH est attribuée à la synthèse et à l'accumulation d'acides organiques et minéraux par les bactéries, en association avec l'oxydation du soufre et des composés azotés (ce que révèlent l'augmentation des teneurs en SO_4^{2-} et NO_3^- dans l'eau de percolation). Les composés siliceux subissent eux aussi une transformation importante : suite à la biodégradation, le SiO_2 cristallin (hydrosilicates) passe progressivement sous une forme amorphe, plus facilement solubilisée (et évacuée par l'eau de percolation dont la teneur en SiO_2 total augmente). Du point de vue des composés calciques, on voit disparaître la portlandite (dérivé de Ca(OH)_2) au bénéfice de la calcite (examen en diffraction X et augmentation de la perte au feu).

D'un point de vue cinétique, tous les échantillons du matériel expérimental ont manifesté des signes évidents de corrosion après 640 jours d'exposition. Toutefois, certains éléments ont subi une biodégradation manifeste après seulement 80 et 134 jours d'exposition.

Tableau 4.7 Paramètres physicochimiques de bétons altérés soumis à corrosion naturelle en milieu marin (tour de refroidissement d'un centrale thermique en mer Noire)

Characteristics	Intact Zone	Partly Degraded Zone	Heavily Degraded Zone
pH	11.5	9.5	8.8
Insoluble residue (%)	64.28	61.55	55.20
Calcination losses (%)	3.74	5.80	10.70
Elemental content of mortar (%)			
SiO_2	5.04	3.37	2.36
SiO_2 , amorphous	0.71	0.96	1.67
CaO	17.96	18.22	18.90
Ca(OH)_2	0.96	0.21	None
Composition of water extract (%)			
SiO_2 , total	0.0300	0.0594	0.1217
SO_4^{2-}	0.1361	0.2912	0.7560
NO_2^-	0.0001	0.0002	0.0002
NO_3^-	0.0045	0.0126	0.0758

On peut interpréter la dégradation des ciments par des communautés bactériennes comme suit :

- des bactéries se développent dans des microzones où le pH est relativement bas (9-11), en raison de la présence de composés "neutres" (sable, roches écrasées) en contact avec les ciments alcalins. Les organismes hétérotrophes se développent en minéralisant les composés organiques complexes utilisés comme additifs en composés plus simples (nutriments). Les cyanophycées, omniprésentes, fournissent également les composés organiques de leurs gaines aisément dégradables (alginates, mucopolysaccharides, protéines, ...).

- des bactéries sulfatoréductrices transforment les sulfates en hydrogène sulfuré, lui-même oxydé en acide sulfurique par les thiobacilles (forte chute du pH).

- les bactéries nitrifiantes oxydent l'ammonium en acides nitreux et nitrique

- les acides forts produits sont les principaux agents de corrosion des mortiers dont la résultante (aux pH rencontrés au départ) est la dégradation des hydrosilicates (avec élimination de la silice dans les eaux de percolation) et l'apparition de calcite (carbonation) en lieu et place de portlandite. Ceci conduit à une fragilisation extrême des structures en question. L'effritement des couches externes permet à la corrosion de se propager en profondeur.

L'incorporation de substances bactériostatiques ou bactéricides aux blocs expérimentaux (chlorure de polybenzyl-pyridinium, chlorure de alkyl-diméthyl-benzylammonium) ou de composés utilisés pour contrôler le fouling (APB40, latex d'organoétain) s'est montré totalement inefficace, tant pour prévenir l'attaque (incorporation au mortier liquide) que pour la "guérir" (pulvérisations de surface). Ces substances antifouling, en inhibant le développement des biocénoses de macroorganismes en surface des structures marines immergées ou soumises aux embruns, facilitent le travail des communautés bactériennes intervenant dans la dégradation.

Tableau 4.8 Paramètres physicochimiques de bétons altérés soumis à corrosion expérimentale pendant 640 jours en milieu marin (mer Noire)

Characteristics	Intact Zone	Corrosion Zone
pH	12.55	10.09
Insoluble residue (%)	56.88	53.22
Calcination losses (%)	3.80	10.20
Elemental content of mortar (%)		
SiO ₂	6.41	1.40
SiO ₂ , amorphous	0.27	2.28
CaO	22.29	23.34
Ca(OH) ₂	3.17	None
Composition of water extract (%)		
SiO ₃ ²⁻ , total	0.0174	0.1522
SO ₄ ²⁻	0.0512	0.1838
NO ₂ ⁻	0.0001	0.0004
NO ₃ ⁻	0.0008	0.0016

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Puisque l'activité de l'homme sur les continents a eu pour effet de transformer l'océan en poubelle du globe, on pourrait craindre encore plus les effets de l'exploitation des océans sur ses écosystèmes. Heureusement, la conscience du danger est aujourd'hui assez vive dans l'opinion de tous, et, on peut l'espérer, dans celle des "décideurs" pour provoquer de saines réactions.

Chacun sait que les avantages qu'on pourra retirer de l'exploitation des océans n'auront de sens que si on en minimise les coûts, et tout particulièrement les coûts écologiques. Les écosystèmes ont développé une *stratégie de régulation permettant un bouclage optimal des transferts de matière et d'énergie*, et qui assure un *recyclage des composés biogéniques* aux meilleures conditions. Perturbés par l'activité humaine, ces écosystèmes sont capables d'*absorber une partie de nos déchets*, même synthétiques, par adaptation des micro biocénoses naturelles débouchant sur la *biodégradation et le recyclage des polluants* ainsi artificiellement introduits. Deux problèmes importants subsistent : d'une part, les molécules issues de la biodégradation des polluants sont parfois plus toxiques que les molécules initiales, et surtout, le taux d'apport des composés à dégrader est souvent de plusieurs ordres de grandeur supérieur aux vitesses de dégradation de ces composés.

Une perspective a été envisagée, mettant à profit les biotechnologies pour sélectionner, "améliorer" et produire à grande échelle des souches de microorganismes "intéressants" (Fig. 5.1).

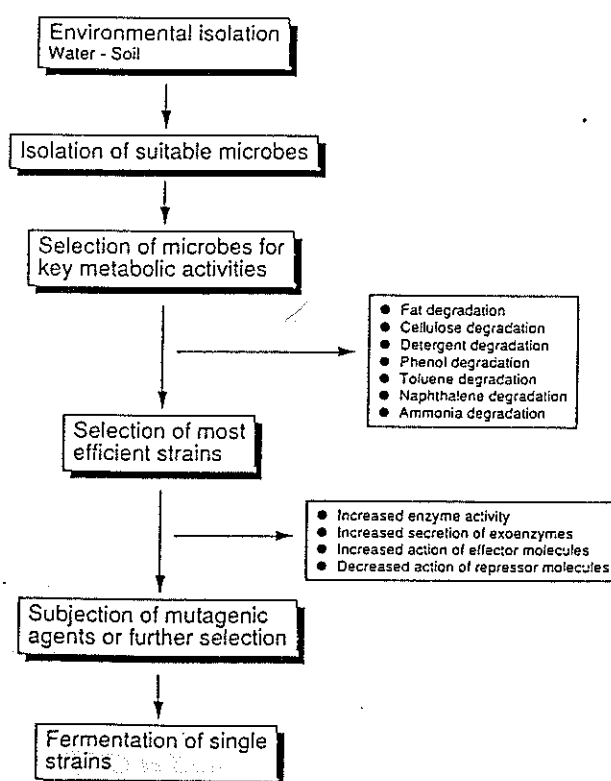


Fig. 5.1 Stratégie d'isolement, d'amélioration et de production de souches bactériennes intéressantes sur le plan de la biodégradation des polluants

Conclusions

La commercialisation de telles souches de bactéries de dépollution a commencé, avec comme marché, les stations d'épuration (municipales ou attachées à un site industriel), les sites de forage pétrolier...

A titre d'exemple, la firme française **PROTEX** commercialise la ligne **AQUAPROX** où différents "produits" spécifiques sont proposés pour résoudre des problèmes particuliers depuis la dégradation des résidus de papeterie riches en lignine (LG5160) jusqu'aux hydrocarbures sur les plages et dans les raffineries (OL5170) en passant par les composés organiques aromatiques, les détergents, ... (Fig. 5.2).

AQUAPROX FB 5180	Il réduit biologiquement la matière organique se trouvant dans des déchets solides et fibreux. Il liquéfie et digère les excréments des animaux, les ordures ménagères, la végétation morte. Il est utilisé dans les stations d'épuration, les usines alimentaires, les usines d'ordures ménagères, ainsi que dans des opérations de compactage
AQUAPROX LG 5160	Il dégrade la cellulose, l'hémicellulose, les amidons, sucres, tannins, et dérivés de la lignine. Abaisse la DBO et contrôle les MES. Spécialement mis au point pour les boues activées, les usines de pâtes à papier, papeteries, ainsi que les stations d'épuration municipales et industrielles ayant des rejets fibreux à traiter.
AQUAPROX OL 5100	Liquéfie et dégrade biochimiquement les huiles, graisses et matières grasses piégées dans les stations d'épuration et leurs équipements. Pour utilisation dans les stations d'épuration, égouts, conduites.
AQUAPROX OL 5170	Dégrade le pétrole brut et raffiné, ainsi que les autres hydrocarbures du milieu salin. Mis au point pour dégrader les pollutions de matières organiques sur le sol, sur les plages de sable, les cuves de stockage, les raffineries, le long des pipelines, et dans les stations d'épuration.
AQUAPROX PN 5120	Formulé scientifiquement pour augmenter la biomasse dans les effluents contenant des composés organiques, tels que Hydrocarbures aliphatiques et aromatiques, Crésols, Glycols, Phénol, Formaldéhyde, Méthacrylates, Nitriles, Naphthalènes, graisse, Alcools, Détergent et Surfactants, Amines, Kérosène, Hétérocycles tels que la Morpholine et Pyridine, Phénols ethoxylés et cires. Les cyanures sont biologiquement dégradés.

Fig. 5.2 Extrait du catalogue PROTEX de "produits" pour le traitement biologique des eaux.

Toujours selon le catalogue de cette firme, *"l'augmentation de la biomasse [...] permet l'application de micro-organismes spécialisés et présélectionnés aux installations de traitement des eaux usées ainsi que sur des sites pollués accidentellement.*

[...]

Les principaux avantages sont :

- ♦ meilleure élimination des DCO, DBO, MES et COT
- ♦ élimination de composés organiques spécifiques
- ♦ augmentation de la capacité de l'installation
- ♦ amélioration des performances par temps froid
- ♦ ..."

Conclusions

Ces perspectives de "développement" de *bactéries de dépollution* susceptibles de digérer pétroles, PCBs, métaux lourds, etc. apparaissent séduisantes, ... toutefois cette médaille pourrait avoir un revers :

- ♦ le développement de ces souches "améliorées" ne change rien quant aux voies métaboliques de dégradation des composés synthétiques. Si cette dégradation génère des *composés toxiques* (cycles aromatiques, détergents, ...), ceux-ci "bénéficieront" également de l'activité accrue des microorganismes et seront injectés dans l'environnement à des *concentrations supérieures* à celles que l'on rencontre actuellement.

- ♦ on se préoccupe moins semble-t-il de l'*introduction éventuelle de recombinants* dans des stations d'épuration biologique, c'est-à-dire indirectement, dans le milieu naturel, eaux douces et océans, que de la mise sur le marché de ces "bioproduits". Pourtant, la même diffusion dans le milieu naturel de caractères spécifiques (tels que les hautes capacités de biodégradation) peut être redoutée. Il serait sans doute dommageable, au niveau de l'exploitation de certains gisements d'y voir se multiplier des micro-organismes destructeurs. Par l'absence d'expérience, l'utilisation de *microorganismes manipulés* présente là encore davantage de risques que la sélection de souches naturelles présentant les affinités recherchées.

Même si cela relève de la pure hypothèse, il faut aussi affiner la connaissance de l'action éventuelle de tels organismes sur des constituants moléculaires (phénols, polycycles aromatiques, ...) essentiels à la vie. La production intense de ligninases (envisagée dans le cadre d'un programme de bioingénierie baptisé "bioéthanol") pourrait ouvrir des voies intéressantes dans l'optique de la dégradation des molécules aromatiques cycliques (hydrocarbures, détergents, cycles polychlorés, pesticides et PCBs, ...), mais l'existence de tels microorganismes, susceptibles de proliférer sur des arbres vivants, peut faire se poser ce type d'interrogation.